

**DC und Fluorometrie  
phenolischer Pflanzeninhaltsstoffe**

Paul Diesel

1974



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41556029\\_0030](https://archive.org/details/IA41556029_0030)





DC und Fluorometrie phenolischer Pflanzeninhaltsstoffe

---

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Paul Diesel

aus

Weilheim

---

Oktober

1974

Die bei Folienprojektor benutzten Folienentwicklungs-  
mittel

Lehrstuhl für Chemie und Biochemie

Lehrstuhl für Chemie und Biochemie

Lehrstuhl für Chemie und Biochemie

Lehrstuhl für Chemie und Biochemie

in Wien



Verfasser

Von

Prof. Dr. H. Wagner

und

Prof. Dr. L. Hörhammer

|                             |                        |
|-----------------------------|------------------------|
| 1. Berichterstatter:        | Prof. Dr. H. Wagner    |
| 2. Berichterstatter:        | Prof. Dr. L. Hörhammer |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 11.12.1974             |

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                           | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. EINLEITUNG . . . . .                                                                                   | 1     |
| ALLGEMEINER TEIL                                                                                          |       |
| 2. Fluorometrie . . . . .                                                                                 | 2     |
| 2.1. Physikalische Grundlagen der Fluoreszenz . . . . .                                                   | 2     |
| 2.2. Praktische Anwendung der Fluorometrie . . . . .                                                      | 8     |
| 2.2.1. Fluoreszenzphotometrie . . . . .                                                                   | 8     |
| 2.2.2. Fluoreszenzspektrometrie . . . . .                                                                 | 9     |
| 3. Fluorometrische Direktauswertung . . . . .                                                             | 13    |
| 3.1. Zur DC-Direktauswertung . . . . .                                                                    | 13    |
| 3.2. Zur quantitativen Bestimmung adsorbierter Substanzen                                                 | 14    |
| 3.3. Übersicht über die mit der von uns verwendeten<br>Gerätekombination möglichen Meßverfahren . . . . . | 15    |
| 3.4. Bisherige fluorometrische Bestimmungsmethoden<br>in der Naturstoffanalytik . . . . .                 | 17    |
| 4. Zur Analytik phenolischer Pflanzeninhaltsstoffe<br>durch DC-Direktauswertung . . . . .                 | 20    |
| 4.1. Problematik der Naturstoffanalytik . . . . .                                                         | 20    |
| 4.2. Übersicht über die untersuchten phenolischen<br>Pflanzeninhaltsstoffe . . . . .                      | 21    |
| 5. Analytik der Silymarine . . . . .                                                                      | 24    |
| 5.1. Voraussetzungen für die Wertbestimmung der<br>Silymarine durch DC-Direktauswertung . . . . .         | 24    |
| 5.1.1. Auswahl des geeigneten Direktauswerteverfahrens . .                                                | 24    |
| 5.1.1.1. Voruntersuchungen . . . . .                                                                      | 24    |
| 5.1.1.2. Aufnahme der Remissionsspektren . . . . .                                                        | 28    |
| 5.1.1.3. Vergleich der verschiedenen Direktauswerteverfahren .                                            | 28    |
| 5.1.2. Detektion der Silymarine mit Diphenylborsäure- $\beta$ -<br>aminoäthylester . . . . .              | 30    |
| 5.1.2.1. Überprüfung der Proportionalität zwischen<br>Fluoreszenzintensität und Konzentration . . . . .   | 30    |

|          | Seite                                                                                                   |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5.1.2.2. | Modifizierung der Detektion mit<br>Diphenylborsäure- $\beta$ -aminoäthylester . . . . . 32              |
| 5.1.2.3. | Untersuchung der Fluoreszenz in Abhängigkeit<br>von der Zeit . . . . . 33                               |
| 5.1.3.   | Zur Qualitätsbeurteilung der<br>fluorometrischen Direktauswertung . . . . . 36                          |
| 5.1.3.1. | Präzision der Peakflächenmessung . . . . . 36                                                           |
| 5.1.3.2. | Präzision der Bestimmungsmethode im Modellversuch . 37                                                  |
| 5.1.3.3. | Korrelation und Regressionsgerade im Modellversuch . 38                                                 |
| 5.1.4.   | Zur DC der Silymarine . . . . . 40                                                                      |
| 5.1.4.1. | Bisherige chromatographische Verfahren . . . . . 41                                                     |
| 5.1.4.2. | Entwicklung eines neuen chromatographischen<br>Verfahrens als Voraussetzung der DC-Direktauswertung 42  |
| 5.1.4.3. | Einfluß der Kammersättigung auf das Trennergebnis . . 47                                                |
| 5.1.4.4. | Einfluß der Mehrfachentwicklung auf das Trennergebnis 47                                                |
| 5.2.     | Bezugssystem der Silymarin-Wertbestimmung . . . . . 49                                                  |
| 5.2.1.   | Silybin als Referenzsubstanz . . . . . 49                                                               |
| 5.2.2.   | Absolutbestimmung von Silydianin . . . . . 50                                                           |
| 5.3.     | Fluorometrische Wertbestimmung von Silymarinen<br>in Drogenmustern und Arzneispezialitäten . . . . . 50 |
| 5.4.     | Weitere Beiträge zur Analytik der Silymarine . . . . . 57                                               |
| 6.       | Quantitative Bestimmung von Rutin in einer Droge<br>und einer Arzneispezialität . . . . . 61            |
| 6.1.     | Voraussetzung für die Wertbestimmung des Rutins<br>durch DC-Direktauswertung . . . . . 61               |
| 6.2.     | Wertbestimmung von Herba Rutae . . . . . 63                                                             |
| 7.       | Fluorographie von Flavondrogen . . . . . 65                                                             |
| 7.1.     | Zur Methodik der Fluorographie . . . . . 65                                                             |
| 7.2.     | Fluorogramme . . . . . 67                                                                               |
| 8.       | Weitere Beiträge zur Analytik phenolischer<br>Pflanzeninhaltsstoffe . . . . . 96                        |
| 8.1.     | Identifizierung und Unterscheidung einiger Flavon-<br>drogen durch visuelle Auswertung . . . . . 102    |

|      |                                                                                                                               |     |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 8.2. | Entwicklung eines modifizierten Fließmittelsystems<br>zur chromatographischen Trennung unpolarer<br>Flavonglykoside . . . . . | 102 |
| 9.   | ZUSAMMENFASSUNG . . . . .                                                                                                     | 105 |
| 10.  | EXPERIMENTELLER TEIL . . . . .                                                                                                | 106 |
| 11.  | ANHANG 1 . . . . .                                                                                                            | 122 |
| 12.  | ANHANG 2 . . . . .                                                                                                            | 124 |
| 13.  | ANHANG 3 . . . . .                                                                                                            | 127 |
| 14.  | LITERATURVERZEICHNIS . . . . .                                                                                                | 129 |



## EINLEITUNG

In der Arzneimittelanalytik gewinnen fluorometrische Verfahren immer mehr an Bedeutung. Während die Fluorometrie einzelner Naturstoffe oder synthetischer Verbindungen heute bereits zur Routine gehört, befindet sich die fluorometrische Bestimmung von Verbindungen durch Direktauswertung nach dünnsschichtchromatographischer Auftrennung noch im Entwicklungsstadium. Dabei bietet die Kopplung von chromatographischer Trennung mit fluorometrischer Bestimmung eine ideale Voraussetzung für die quantitative Bestimmung pflanzlicher Naturstoffe.

Große Schwierigkeiten bereitet auch heute noch die Wertbestimmung von Drogen mit phenolischen Inhaltsstoffen, da diese Stoffgruppe über eine große Zahl von Strukturvarianten verfügt und in den Pflanzen in einer sehr komplexen Zusammensetzung vorkommt.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es daher sein, ein fluorometrisches DC-Direktauswerteverfahren zu entwickeln, das sich zur Bestimmung von Flavonoiden und den erst kürzlich entdeckten Flavonolignanen (Silymarinen) in Drogen und Drogenzubereitungen eignet. Es war ferner zu prüfen, ob die Fluorometrie auch zur routinemäßigen Identitäts- und Reinheitsprüfung von Arzneidrogen mit vorwiegend phenolischen Inhaltsstoffen eingesetzt werden kann.

## ALLGEMEINER TEIL

### 2. FLUOROMETRIE

#### 2.1. PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN DER FLUORESZENZ

Die große Bedeutung spektroskopischer Methoden in der modernen Arzneimittelanalytik führte in den letzten zehn Jahren zu einer lawinenartig zunehmenden Zahl von Publikationen. Der weitaus größte Teil dieser Veröffentlichungen bezieht sich dabei auf die Absorptionsspektroskopie im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich und auf die Infrarotspektroskopie. Verglichen damit findet man relativ wenig Literatur über die Theorie und die praktische Anwendung der Fluorometrie. Während das Phänomen Fluoreszenz bereits lange bekannt ist, konnte deren Untersuchung erst nach der Entwicklung hochempfindlicher Meßgeräte in den letzten beiden Jahrzehnten wesentlich verbessert werden. Die Anwendung wellenmechanistischer Vorstellungen für die Aufnahme und Abgabe der Strahlungsenergie fluoreszierender Moleküle erlaubte fundierte Interpretationen der beobachteten Erscheinungen. Trotz dieser Fortschritte sind auf Grund der komplexen Struktur der Fluoreszenz einige Effekte auch heute noch nicht restlos geklärt. Da die theoretischen Grundlagen und die möglichen Einflußfaktoren auf den Meßvorgang bei der Direktauswertung von großer Bedeutung sind, werden sie in einer kurzen Einführung abgehandelt und die im Zusammenhang mit fluorometrischen Analysen verwendeten Begriffe definiert.

Als Fluoreszenz bezeichnet man einen Übergang angeregter Moleküle aus einem energiereicheren in einen energieärmeren Zustand unter Aussendung von Strahlung. Der angeregte Zustand kann dabei durch Absorption unterschiedlicher Strahlung erreicht werden: beispielsweise kann aus der Absorption einer Röntgenstrahlung eine Fluoreszenz resultieren, deren Strahlung im Spektralbereich der Rönt-

genwellen liegt. Die weiteren Ausführungen beschränken sich jedoch auf den Teil der Fluoreszenzerscheinungen, die durch Absorption von Lichtquanten im ultravioletten und sichtbaren Wellenlängenbereich eine Anregung zur Emission erfahren (Photoluminiszenzbereich).

Die Fluoreszenz und verwandte physikalische Vorgänge lassen sich an Hand des von Jablonski<sup>1)</sup> eingeführten Termschemas (Abb. 1) anschaulich beschreiben. Ausführliche Informationen darüber können der einschlägigen Fachliteratur entnommen werden<sup>1-9)</sup>.

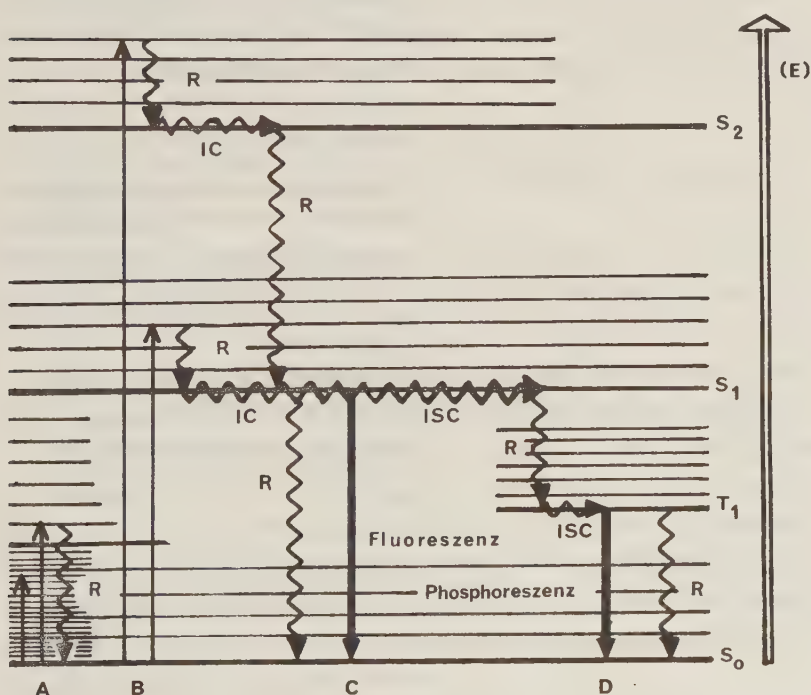


Abb. 1

Jablonski Termschema

Erläuterungen der in Abb. 1 verwendeten Bezeichnungen:

|                    |                                                                                                                                                              |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\longrightarrow$  | strahlender Übergang                                                                                                                                         |
| $\rightsquigarrow$ | strahlungsloser Übergang                                                                                                                                     |
| S                  | Singulettzustand                                                                                                                                             |
| $S_0$              | Singulettgrundzustand                                                                                                                                        |
|                    | Die in diesem Zustand möglichen Rotations- und Rotationsschwingungszustände werden durch die waagrechten Linien zwischen $S_0$ und $S_1$ wiedergegeben       |
| $S_1, S_2$         | angeregte Singulettzustände                                                                                                                                  |
| $T_1$              | angeregter Tripletzustand                                                                                                                                    |
| IC                 | internal conversion, ein isoenergetischer Übergang von einem niedrigen Niveau eines Zustands in ein hochenergetisches Niveau des nächstniedrigeren Zustandes |
| ISC                | intersystem crossing, Übergang zwischen Singulett- und Tripletzustand                                                                                        |
| R                  | relaxation, strahlungsloser Desaktivierungsvorgang                                                                                                           |
| A                  | Absorption von Lichtquanten des infraroten Spektralbereiches                                                                                                 |
| B                  | Absorption von Lichtquanten aus dem ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich                                                                            |
| C                  | Fluoreszenz                                                                                                                                                  |
| D                  | Phosphoreszenz                                                                                                                                               |

Von grundsätzlicher Bedeutung für die Praxis der fluorometrischen Analytik ist die Kenntnis der mit der Fluoreszenz konkurrierenden Prozesse. Während die höheren angeregten Zustände durch eine sehr kurze Lebensdauer (ca.  $10^{-12}$  s) gekennzeichnet sind, findet der Vorgang der "internal conversion" vom untersten Niveau des ersten angeregten Singulettzustandes zum Grundzustand verhältnismäßig langsam statt ( $10^{-9}$  s). Die daran anschließende Energieabgabe kann unter Emission einer Fluoreszenzstrahlung erfolgen. In den meisten Fällen findet jedoch ein Relaxationsvorgang statt, bei dem die Energie strahlungslos deaktiviert wird. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß durch die Änderung der Spinrichtung des angeregten Elektrons das Molekül aus dem Singulettzustand in einen Triplettzustand übergeführt wird. Aus diesen langlebigen Triplettzuständen kann durch einen zweiten ISC-Vorgang mit anschließender Relaxation oder anschließender Emission von Phosphoreszenzstrahlung der Singulettgrundzustand wieder erreicht werden.

Auf Grund der beschriebenen Vorgänge muß die Definition der Fluoreszenz erweitert werden:

Fluoreszenz ist ein strahlender Übergang eines angeregten Moleküls in den Grundzustand, der innerhalb einer Zeit von  $10^{-9}$  s nach der Anregung erfolgt.

Die Länge der Pfeile symbolisiert im Termschema die Energiedifferenz zwischen zwei Zuständen eines Moleküls. Für  $\Delta E$  gilt die Einstein-Bohrsche Beziehung

$\Delta E = h \cdot \nu$ , wobei  $h$  die Plancksche Wirkungskonstante und  $\nu$  die Frequenz der Strahlung ist. Aus dem Termschema ist bereits graphisch zu entnehmen, daß die Energie der Fluoreszenzstrahlung nicht größer als die Energie der anregenden Strahlung sein kann. Dieser Zusammenhang wird in dem Stokeschen Gesetz formuliert, das besagt, die Wellenlänge der Fluoreszenz ist gleich oder länger als die Wellenlänge der Excitationsstrahlung. Im Sonderfall gleicher Wellenlängen spricht man von Resonanzfluoreszenz.

Neben dem Polarisationsgrad und der Lebensdauer dienen zur Charakterisierung der Fluoreszenz in erster Linie ihre Spektren. Man unterscheidet dabei zwischen einem Anregungsspektrum und einem Emissionsspektrum. Das Anregungs-

spektrum - auch als Excitationsspektrum bezeichnet - gibt die Intensität der Emission in Abhängigkeit von der anregenden Strahlung wieder, während das Emissionsspektrum die spektrale Verteilung der emittierten Fluoreszenz beschreibt.

Die Struktur der angeregten Zustände lassen die Excitationsspektren erkennen, die Emissionsspektren geben über den Molekülgrundzustand Auskunft. Diese Zusammenhänge lassen sich aus dem Franck-Condon-Prinzip ableiten<sup>2,4,5</sup>, das außerdem Aufschluß über die O-O-Übergänge und die häufig zu beobachtende Spiegelbildsymmetrie der beiden Spektren gibt.

Eine Meßgröße der Fluoreszenz von großer praktischer Bedeutung ist die Intensität der Sekundärstrahlung. Im Gegensatz zur Absorptionsphotometrie, die dem Lambert-Beerschen Gesetz gehorcht, besteht bei der Fluoreszenzphotometrie kein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration eines fluoreszierenden Stoffes und der Fluoreszenzintensität. Bei  $10^{-3}$ -molaren Lösungen und Lösungen höherer Konzentration sind die gelösten Moleküle bereits so nahe benachbart, daß ihre Strahlungsfelder miteinander gekoppelt werden. Durch Energiewanderung von angeregten Molekülen zu nicht angeregten Molekülen kommt es zu einem Effekt, der als Konzentrationsquenching bezeichnet wird. Dabei nimmt trotz steigender Konzentration die Fluoreszenzintensität wieder ab. Die graphische Darstellung dieses Zusammenhangs ergibt einen Kurvenverlauf, wie er aus der Abb. 2 zu ersehen ist.

Eine Proportionalität zwischen Konzentration und Intensität der Fluoreszenzstrahlung ist nur in einem bestimmten Bereich zu erwarten. Quantitative Fluoreszenzanalysen sind deshalb auf den Nannogrammbereich beschränkt. Die Fluoreszenzphotometrie ist dadurch als extrem empfindliche Nachweismethode gekennzeichnet.

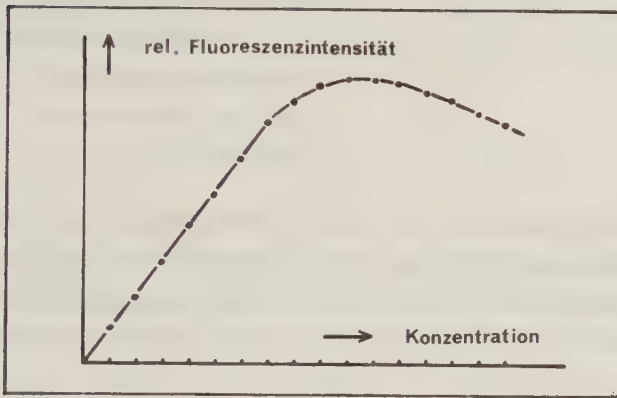


Abb. 2

Konzentrations-Intensitätsdiagramm der Fluoreszenz

Mathematisch wird der Zusammenhang zwischen den verschiedenen Größen durch folgende Gleichung beschrieben<sup>10, 11)</sup>

$$I_{fl} = I_0 \cdot (1 - 10^{-\epsilon \cdot c \cdot d}) \cdot \Phi$$

oder vereinfacht für verdünnte Lösungen

$$I_{fl} = I_0 \cdot (2,3 \cdot \epsilon \cdot c \cdot d) \cdot \Phi$$

|            |                                     |
|------------|-------------------------------------|
| $I_{fl}$   | Intensität der Fluoreszenzstrahlung |
| $I_o$      | Intensität der anregenden Strahlung |
| $\epsilon$ | molarer Extinktionskoeffizient      |
| $c$        | Konzentration in Mol/Liter          |
| $d$        | wirksame Schichtdicke in cm         |
| $\Phi$     | Quantenausbeute                     |

Da nun  $\epsilon$  eine Stoffkonstante ist,  $I_o$  und  $d$  konstant gehalten werden können und auch die Quantenausbeute bei sehr starker Verdünnung konstant bleibt, ergibt sich zwischen  $I_{fl}$  und der Konzentration  $c$  eine direkte Proportionalität. Sie stellt die Grundlage für alle quantitativen Bestimmungen mit Hilfe der Fluoreszenzanalyse dar.

Unabhängig von der Konzentrationslöschung kann sich die Quantenausbeute einer Fluoreszenz durch Löschvorgänge verringern, die durch Fremdstoffe wie Sauerstoff oder Metallatome ausgelöst werden. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl organischer Verbindungen, die als Akzeptoren für die Anregungsenergie in Erscheinung treten können.

## 2.2. PRAKTISCHE ANWENDUNG DER FLUOROMETRIE

Verglichen mit der Absorptionsspektrophotometrie ist die Fluorometrie ein kompliziertes Meßverfahren, da sich mehrere variable Größen gegenseitig beeinflussen. Innerhalb der Fluorometrie lässt sich eine Unterscheidung zwischen Fluoreszenzphotometrie und Fluoreszenzspektrometrie treffen.

### 2.2.1. Fluoreszenzphotometrie

Die Fluoreszenzphotometrie wird in erster Linie zur Bestimmung einer unbekannten Konzentration eines fluoreszierenden Stoffes eingesetzt. Als bekannt vorausgesetzt werden bei solchen Messungen die Wellenlängen für Excitation und Emission. Da die registrierte Fluoreszenz von einer Vielzahl von Größen beeinflusst wird, müssen alle Parameter, mit Ausnahme des zu untersuchenden, konstant gehalten

werden. Man erreicht dies durch standardisierte Meßbedingungen wie gleichbleibende Meßgeometrie, konstante Wellenlängen und definierte Bandbreiten. Im Gegensatz zur Absorptionsphotometrie arbeitet man in der Fluoreszenzphotometrie ausschließlich im Einstrahlverfahren.

### 2.2.2. Fluoreszenzspektrometrie

Quantitative Fluoreszenzphotometrie setzt die Kenntnis der Anregungs- und Emissionsspektren voraus. Zur Ermittlung dieser Größen bedient man sich mit Vorteil sogenannter Spektralphotofluorometer. Diese Geräte haben einen gemeinsamen grundsätzlichen Aufbau. Sie bestehen aus einer Lichtquelle, die ein Kontinuum abstrahlt, einem Monochromator zur Selektion der Excitationswellenlänge, einer Meßküvette bzw. einem Adapter zur DC-Direktauswertung, einem zweiten Monochromator zur Aussonderung der Emissionswellenlänge und einem lichtelektrischen Empfänger. Das erhaltene Meßsignal wird auf einer Anzeige sichtbar gemacht oder durch einen Schreiber registriert. Die Kopplung des Wellenlängenantriebs mit einem Motor ermöglicht ein kontinuierliches Abtasten des gesamten Wellenlängenbereichs. Auf diese Weise können Spektren unmittelbar aufgenommen werden.

Praktisch geht man dabei so vor, daß man eine ungefähre Emissionswellenlänge fest einstellt. Mit dem zweiten Monochromator wird dann vom kurzwelligen Ende des Spektrums zur Emissionswellenlänge gefahren und so das Excitationsspektrum registriert. Aus der resultierenden Kurve sind die zur Fluoreszenzanregung intensiven Banden zu erkennen.

Im zweiten Meßvorgang wird dann auf ein Maximum der Anregung eingestellt und vom Emissionsmonochromator der Bereich von dieser Wellenlänge zum langwelligen Ende des Spektralbereiches abgetastet. Man erhält so ein zweites Kurvenbild - das Emissionsspektrum -.

Die für UV-Absorption, Fluoreszenzexcitation, Fluoreszenzemission und Phosphoreszenzemission typischen Kurvenbilder sind in Abb. 3 wiedergegeben.

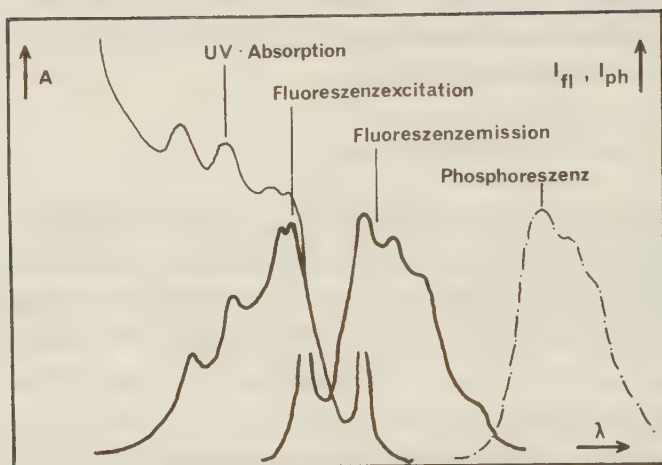


Abb. 3

Vergleich von Absorptions-, Fluoreszenz- und Phosphoreszenzspektren

Nebeneffekte, die bei der Aufnahme der Spektren auftreten, können durch geeignete Maßnahmen verhindert werden oder müssen bei der Interpretation entsprechend berücksichtigt werden.

Eine auffällige Erscheinung ist der sprunghafte Anstieg der registrierten Intensität im Bereich gleicher Wellenlängen an beiden Monochromatoren, bedingt durch die Streuung des eingestrahlichten Lichts an Grenzflächen und Partikeln. Während bei geringer Verstärkung und beim Messen in klaren Lösungen dieser Effekt wenig stört, tritt er vor allem bei der Aufnahme von Spektren, die von einer DC-Platte direkt aufgenommen werden, stark ausgeprägt auf.

Neben dieser reinen Streuung (Rayleigh Scatter), bei der die Frequenz von einestrahlem und gestreutem Licht gleich ist, treten auch Vorgänge auf, die durch einen Energieaustausch zwischen Primärstrahlung und streuenden Molekülen gekennzeichnet sind (Raman Scatter).

Die in der Arbeit wiedergegebenen Spektren sind relative Spektren, die vor allem durch die unterschiedliche Dispersion der Monochromatoren und die verschiedene spektrale Empfindlichkeit des lichtelektrischen Empfängers verfälscht sind. Es gibt außerdem keine Lichtquelle, die über den gesamten Wellenlängenbereich quantengleich Licht emittiert. Will man aber quantenrichtige, absolute Spektren aufnehmen, so muß durch geeignete Maßnahmen die Anzeige über den ganzen Wellenlängenbereich korrigiert werden<sup>12, 13)</sup>. Für unsere Untersuchungen war eine Korrektur der Spektren nicht erforderlich.

Die Abb. 4 gibt das für die Untersuchungen verwendete Fluorescence Spectrophotometer MPF - 3 der Fa. Perkin-Elmer in der verwendeten Anordnung mit den Zusatzgeräten wieder. Den schematischen Aufbau des MPF - 3 zeigt das System-Diagramm.

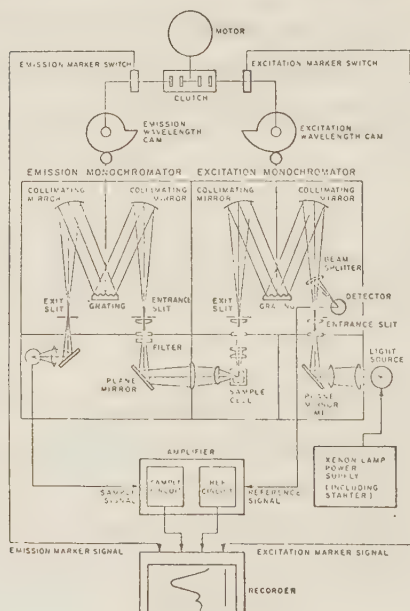
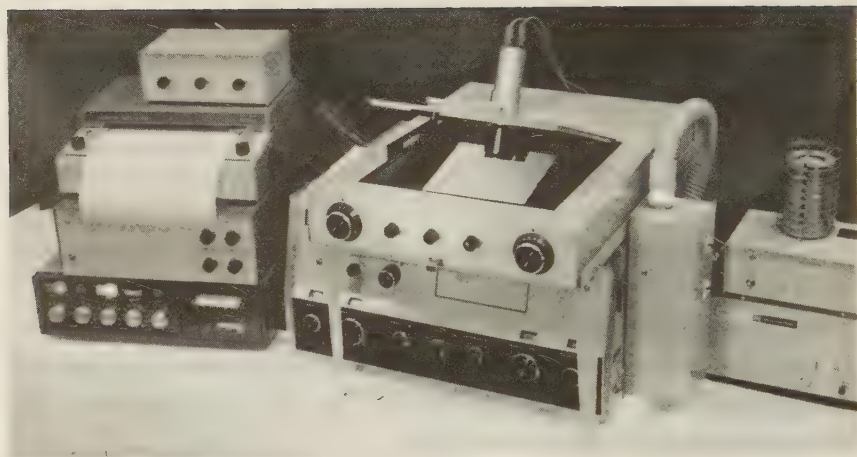


Abb. 4

Geräteanordnung und System-Diagramm des verwendeten

Spektralfluorometer MPF - 3

### 3. FLUOROMETRISCHE DIREKTAUSWERTUNG

#### 3.1. ZUR DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAMM-DIREKTAUSWERTUNG

Den intensiven Forschungsarbeiten verschiedener Arbeitskreise, vor allem aber den umfangreichen Untersuchungen von Jork, ist es zu verdanken, daß die photometrische Bestimmung adsorbierter Substanzen aus dem Versuchsstadium heraus zu einer universell einsetzbaren analytischen Methode entwickelt wurde<sup>14-30)</sup>. Während anfangs die Parameter dieser neuen Methode bei Absorptionsmessung an einfachen Modellgemischen im Vordergrund der Untersuchungen standen, gilt heute das Interesse mehr den Anwendungsmöglichkeiten. Zur Verbesserung der Meßergebnisse wurden Methoden entwickelt, die die DC-Direktauswertung mit der elektronischen Datenverarbeitung koppeln<sup>16, 31-37)</sup>. Von besonderer Bedeutung sind Verfahren, die eine Optimierung des Verhältnisses zwischen Untergrund- und Meßsignal zum Ziel haben<sup>38-40)</sup> oder die Möglichkeiten zur Standardisierung der direkten spektrophotometrischen Auswertung bieten<sup>39, 41, 42)</sup>. Hier ist vor allem die Entwicklung der Simultanmessung zu nennen<sup>34, 39, 40)</sup>.

Im Rahmen dieser Darstellungen wird eine Vielzahl variierender Bezeichnungen für die Direktauswertung und deren Parameter verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen werden im Folgenden wiedergegeben.

Nach der Art der Meßgeometrie unterscheidet man zwischen Transmissions- und Remissionsmessungen. Messungen in Remissionsanordnung sind denen in Transmissionsanordnung überlegen, weil sich Inhomogenitäten im Sorbensmaterial nicht so stark auf den registrierten Untergrund auswirken.

Neben der Beschreibung der Meßgeometrie ist eine Bezeichnung des physikalischen Vorgangs, der der Bestimmung zugrunde liegt, erforderlich. Hierbei unterscheidet man zwischen densitometrischen Messungen, die auf einer unspezifischen Minderung eines eingestrahnten weißen Lichtes beruhen, und spektralphotometrischen Verfahren. Der weitaus größte Teil der in der Literatur beschriebenen

DC-Direktauswertungen wurde mit spektralphotometrischen Absorptionsmessungen ausgeführt. Messungen dieser Art führen dann zu falschen Ergebnissen, wenn durch die Absorption der eingestrahnten Energie eine Fluoreszenz induziert wird. Die Messung fluoreszierender Proben kann deshalb nur durch spektralfluorometrische Bestimmungen erfolgen. Dabei wird bei einer monochromatischen Anregungsstrahlung eine Fluoreszenz erzeugt, die Sekundäremission durch den zweiten Monochromator ausgesondert und von einem Meßempfänger registriert.

### 3.2. ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG ADSORBIERTER SUBSTANZEN

Erhält man bei den Absorptionsmessungen gelöster Stoffe durch das Lambert-Beersche Gesetz einen weitgehend linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Extinktion, so erfordern Absorptionsmessungen adsorbierter Substanzen komplizierte Formeln zur Beschreibung dieser Funktion.

Für Absorptionsmessungen in Remission geht man meist von dem nach den Autoren als "Kubelka-Munk-Funktion" bezeichneten Zusammenhang<sup>43, 44)</sup> zwischen registriertem relativen Remissionsgrad  $R_{rel}$ , dem Streukoeffizienten des Materials  $s$  und der Konzentration  $K$  des absorbierenden Stoffes aus. Für die Kubelka-Munk-Funktion muß durch einen Vergleich mit einem Hilfsstandard aus dem gemessenen relativen Remissionsgrad der absolute Remissionsgrad  $R_{abs}$  ermittelt werden.

$$\frac{K}{s} = \frac{(1 - R_{abs})^2}{2 \cdot R_{abs}}$$

Absorptionsmessungen auf der Basis dieser Funktion<sup>18, 25, 45, 46)</sup>, die für die Absorption einer unendlich dicken Probe abgeleitet wurde, blieben nicht unkritisiert, da die Voraussetzung der unendlich dicken Schicht bei der DC-Direktauswertung nicht erfüllt ist. Die Diskussion über die optimale Auswertefunktion hält noch an<sup>8, 14, 41, 47-50)</sup>.

Fluoreszenzmessungen adsorbierter Stoffe folgen den Gesetzmäßigkeiten, die für gelöste Stoffe aufgestellt wurden<sup>11)</sup>. Dadurch wird die quantitative Auswertung wesentlich vereinfacht. Bei konstanter Meßgeometrie und genügend geringer wirk-samer Schichtdicke gilt folgende Proportionalität:

$$I_{fl} \sim I_o (1 - 10^{-\epsilon \cdot c \cdot d}) \cdot \Phi$$

Der Bezug der Fluoreszenzintensität erfolgt durch den Vergleich mit einem unter identischen Bedingungen gemessenen Standard. Man unterscheidet dabei zwischen externem, internem und innerem Standard. Als externer Standard kann ein Körper bekannter Fluoreszenzintensität dienen. Arbeitet man mit einem internen Standard, so wird die zu bestimmende Substanz mit einer bekannten Konzentration dieser Substanz verglichen. Im Gegensatz dazu spricht man von einem inneren Standard, wenn die Untersuchungslösung mit und ohne Zusatz einer definierten Menge des zu bestimmenden Stoffes analysiert wird. Die dazu erforderliche strenge Proportionalität ist in den meisten Fällen nicht zu erfüllen. Deshalb haben wir uns bei der quantitativen fluorometrischen Bestimmung phenolischer Pflanzeninhaltsstoffe für die Verwendung eines chromatogramminternen Standards entschieden.

### 3.3. ÜBERSICHT ÜBER DIE MIT DER VON UNS VERWENDETEN GERÄTEKOMBINATION MÖGLICHEN MESSVERFAHREN

Diese ist in der nachfolgenden Abbildung 5 wiedergegeben. Photometrie und Spektrometrie werden miteinander verglichen. Als Bezeichnungen werden verwendet: F für Fluoreszenzintensität, T für Transmissionsgrad, c für Konzentration,  $\lambda_1$  für Anregungs- bzw. Absorptionswellenlänge und  $\lambda_2$  für Emissionswellenlänge.

| DC - Direktauswertung :                                                                                                                                                                                          | Remission                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Messung gelöster Stoffe                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Transmission                                                                                                                                                                                                     |  $T = f(c)$<br> $F = f(c)$                                                                                                                     |  $T = f(c)$<br> $F = f(c)$                                                                                                                         | <b>PHOTOMETRIE</b><br><br>Absorptionsmessungen<br><br>Fluoreszenzmessungen                         |
|  $F = f(\lambda_1)$<br> $T = f(\lambda_1)$ |  $F = f(\lambda_1)$<br> $F = f(\lambda_2)$<br> $F = f(\lambda_1)$ |  $F = f(\lambda_1)$<br> $F = f(\lambda_2)$<br> $F = f(\lambda_1)$ | <b>SPEKTROMETRIE</b><br><br>Excitationspektren<br><br>Emissionsspektren<br><br>Absorptionsspektren |

Abb. 5

Übersicht über die möglichen Meßverfahren

### 3.4. BISHERIGE FLUOROMETRISCHE BESTIMMUNGSMETHODEN IN DER NATURSTOFFANALYTIK

Die weite Verbreitung, die fluorometrische Bestimmungsverfahren in den letzten zwei Jahrzehnten gefunden haben, ist vor allem auf zwei Faktoren zurückzuführen. Viele Naturstoffe fluoreszieren bereits ohne chemische Umsetzung. Ihre quantitative Erfassung unter Ausnutzung dieser Eigenschaft bietet gegenüber anderen Bestimmungsmethoden Vorteile. Zum anderen kommen viele Naturstoffe in so geringen Konzentrationen vor, daß ihre Analyse mit Hilfe der konventionellen Verfahren (Gravimetrie, Titrimetrie, aber auch Absorptionsphotometrie) nicht mehr durchführbar ist. Dies gilt vor allem für die Gruppe der Hormone, Enzyme, Cancerogene und Alkaloide. Sofern solche Verbindungen eine Eigen-Fluoreszenz besitzen oder sich zu fluoreszierenden Reaktionsprodukten umsetzen lassen, liegt die Erfassungsgrenze im Bereich weniger Nannogramm oder noch wesentlich darunter.

Fluorometrische Bestimmungen unterteilt man zweckmäßig in Analysen von Einzelkomponenten und von Substanzgemischen. Im Bereich der Naturstoffanalytik handelt es sich fast ausschließlich um die Untersuchung von komplexen Substanzgemischen. Sie setzt, von wenigen Fällen abgesehen, eine Trennung der Einzelkomponenten voraus. Mit Vorteil bedient man sich zu diesem Zweck der Dünnschichtchromatographie. Dabei ist zu unterscheiden zwischen indirekten Verfahren, bei denen die Substanzen erst vom Sorbens eluiert und dann fluorometrisch bestimmt werden und den direkten Verfahren, bei denen die Verbindungen im adsorbierten Zustand durch DC-Direktauswertung quantitativ erfasst werden.

Es ist bei der Vielzahl fluorometrischer Analysen nicht möglich, einen umfassenden Überblick über den derzeitigen Stand dieser Methodik zu geben. Deshalb sollen nur einige Übersichtsreferate und die für die vorliegende Arbeit wichtigen Publikationen aufgeführt werden (Tabelle 1).

FLUOROMETRISCHE ANALYTIK

## Übersichtsreferate:

"Fluorometric Analysis", herausgegeben von White und Weissler (I. - XIII. Mitt.) und ab 1974 von Weissler (XIV. Mitt.) erscheint in zweijährigem Abstand in Analytical Chemistry <sup>51-55</sup>)

"Die bisherigen Anwendungsmöglichkeiten der Dünnschicht-Fluorometrie", herausgegeben von Messerschmidt (Überblick über den Einsatz der Fluorometrie zur Analyse von Aminosäuren, Aminen, synth. Arzneistoffen, Alkaloiden, Nukleotiden, verwandten Verbindungen, Steroiden, Alkoholen, Zuckern, Phenolen, Antibiotika und Kohlenwasserstoffen <sup>28</sup>)

Jork und Kraus befassen sich im Rahmen einer Darstellung papier- und dünnsschichtchromatographischer Methoden auch mit der fluorometrischen Direktauswertung <sup>29</sup>)

## Dissertationen:

In drei Dissertationen wird neben der Absorptionsmessung auch auf die Fluoreszenzmessung in Kombination mit der Dünnschicht-Direktauswertung eingegangen:

|                              |                                                     |
|------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Schmid G., Stuttgart (1972): | Anthrachinone                                       |
| Geissler, H., Mainz (1972):  | Catecholamin                                        |
| Röder, K., Mainz (1974):     | Catecholamine, Emetin, Cephaelin und Chinaalkaloide |

## Publikationen:

|                    |                                                                                                                         |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pollak und Boulton | Eine theoretische Studie über die quantitative Erfassung der Fluoreszenz auf Dünnschichtchromatogrammen <sup>56</sup> ) |
| Tausch             | Grenzen und Möglichkeiten der DC-Fluorometrie <sup>57</sup> )                                                           |
| Jänchen            | Einige wichtige Parameter für DC-Fluorometrie <sup>58</sup> )                                                           |
| Klaus              | Zusammenhang zwischen photometrischen Größen und Fleckparametern <sup>27</sup> )                                        |
| Petrowitz          | Sorptionsmitteleinflüsse bei der fluorometrischen Direktanalyse von DC <sup>15</sup> )                                  |
| Boulton            | Effekt der Feuchtigkeit auf die Fluoreszenzausbeute <sup>59</sup> )                                                     |
| Klaus              | Übertragbarkeit von Meßwerten bei der fluorometrischen Direktauswertung <sup>26</sup> )                                 |

|                                     |                                                                                        |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Ebel und Herold                     | DC-Fluorometrie mit on-line Kopplung mit programmierbaren Tischrechnern <sup>31)</sup> |
| Ebel und Herold                     | Bestimmung von Thiabendazol <sup>36)</sup>                                             |
| Doss, Ulshöfer und Philipp-Dormston | Bestimmung von Porphyrinen <sup>60)</sup>                                              |
| Egg und Huck                        | Bestimmung von Testosteron im Urin <sup>61)</sup>                                      |
| Geissler und Mutschler              | Bestimmung von Serotonin im Harn <sup>62)</sup>                                        |
| Förster, Bruhn und Hoos             | Bestimmung von Tri- und Tetraäthyl-rutosiden <sup>63)</sup>                            |
| Niwaguchi und Inoue                 | Bestimmung von LSD <sup>64)</sup>                                                      |
| Steinigen                           | Bestimmung von LSD <sup>65)</sup>                                                      |
| Pötter und Voigt                    | Versuche zur quantitativen Bestimmung von Rauwolfiaalkaloiden <sup>66)</sup>           |
| Hammerstein und Kaiser              | Bestimmung von Rauwolfiaalkaloiden <sup>67)</sup>                                      |
| Lugt u. Noordhoek -Ananias          | Bestimmung von Digitalis-Glykosiden <sup>68)</sup>                                     |
| Doelker, Kapetanidis und Mirimanoff | Bestimmung von Digitaloiden <sup>69)</sup>                                             |

#### Arbeiten zur Direktauswertung phenolischer Naturstoffe:

|                        |                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Wildanger und Herrmann | Bestimmung von Gemüseflavonoiden; eine quantitative spektrophotometrische Bestimmung innerhalb tolerierbarer Fehlergrenzen ist danach nicht möglich; vorgeschlagen wird eine indirekte Bestimmung <sup>70,71)</sup> |
| Hignett                | Quantitative Erfassung von Methyl-O-Cumaraten; alle gezeigten Eichgeraden verlaufen parabelförmig <sup>72)</sup>                                                                                                    |
| Flück und Schwabe      | Quantitative Bestimmung der Crataegus-Flavonoide im Zusammenhang mit verschiedenen Trocknungsbedingungen; keine weiteren Angaben zur Genauigkeit der Methode; keine Eichgeraden <sup>73)</sup>                      |
| Ibrahim                | Quantitative Bestimmung von Pflanzenphenolen durch zweidimensionale DC und Fluorometrie; Sorbens: Kieselgel-Cellulose (1:1); Standardabweichungen zwischen 2,5 und 6,2% <sup>74)</sup>                              |

#### 4. ZUR ANALYTIK PHENOLISCHER PFLANZENINHALTSSTOFFE DURCH DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAMM-DIREKTAUSWERTUNG

##### 4.1 PROBLEMATIK DER NATURSTOFFANALYTIK

Während für stark wirkende Drogen mit wenigen Ausnahmen chemische Wertbestimmungsmethoden existieren, fehlen diese für Drogen mit phenolischen Inhaltsstoffen fast vollständig oder sie sind noch ungenügend entwickelt. Es gibt hierfür zwei wesentliche Gründe. Erstens haben viele phenolische Inhaltsstoffe nicht die gleiche pharmakologische Bedeutung wie z. B. Herzglykoside oder Alkaloide, zum zweiten sind hier die Strukturvarianten so groß, daß noch zahlreiche Verbindungen dieser Klasse bei den einzelnen Drogen unbekannt sind oder erst in den letzten Jahren in ihrer Struktur aufgeklärt werden konnten. Solche Drogen haben nur dann eine Chance, dem Arzneischatz erhalten zu bleiben, wenn es auch hier gelingt, Wertbestimmungsverfahren zu entwickeln, die eine Standardisierung und Qualitätsbeurteilung der Drogen erlauben. Dabei muß Wert darauf gelegt werden, daß anstelle der früher üblichen Gesamtbestimmungsverfahren möglichst Einzelbestimmungen ausgearbeitet werden. Die chemische Gesamtbestimmung genügt zwar meist zur Drogen-Standardisierung, sagt aber in den wenigsten Fällen etwas über die pharmakologische Wirkung der Drogen aus, vor allem dann, wenn die einzelnen Verbindungen des Komplexes unterschiedliche qualitative oder quantitative therapeutische Effekte besitzen. Außerdem kann nur auf dem Wege der Einzelbestimmung etwas über Herkunft, Verfälschungen und Vorliegen chemischer Rassen ausgesagt werden.

Von den heute gebräuchlichen Trennverfahren für Naturstoffe eignet sich die Gaschromatographie nicht zur Untersuchung der phenolischen Pflanzeninhaltsstoffe, weil die zu untersuchenden Verbindungen für eine direkte Analyse zu polar sind. Die Derivatisierung von Naturstoffen führt aber selten zu reproduzierbaren Ergebnissen und setzt komplizierte Anreicherungs- und Reinigungsverfahren voraus. Auch die Hochdruckflüssigkeitschromatographie scheidet zur Analyse dieser Stoffgruppe aus. Die Säulen sind in der HPLC gegenüber Ballaststoffen noch empfindlicher als in der Gaschromatographie. Weitaus größere Schwierigkeiten ergeben

sich bei der Detektion der getrennten Verbindungen. Zur Analyse der komplexen phenolischen Pflanzeninhaltsstoffe reichen Verfahren auf der Basis der UV-Absorption nicht aus. Einfache und billige Systeme zur selektiven Erfassung der unterschiedlichen Verbindungstypen fehlen noch.

Aus diesen Gründen stellt die Dünnschichtchromatographie die derzeit beste Methode zur Untersuchung dieser Naturstoffgruppe dar. Durch Kopplung mit einer spezifischen Detektion und einer anschließenden Direktauswertung erhält man ein Verfahren, das Reinheits- und Identitätsprüfung in einem Arbeitsgang mit der quantitativen Erfassung der Einzelkomponenten ermöglicht. Die Fluorometrie als spezielle Direktauswertemethode ist dabei wegen ihrer hohen Empfindlichkeit allen anderen photometrischen Verfahren überlegen.

#### 4.2. ÜBERSICHT ÜBER DIE UNTERSUCHTEN PHENOLISCHEN PFLANZENINHALTSSTOFFE

Unter der großen Zahl von phenolischen Verbindungen haben in der letzten Zeit vor allem die Flavonolignane von Silybum marianum G. wegen ihrer antihepatotoxischen Wirksamkeit Interesse gewonnen. Die Strukturaufklärung konnte in allerneuester Zeit abgeschlossen werden. Da die Bezeichnung Lignane Verbindungen umfasst, die durch eine C-C-Verknüpfung von Kohlenstoffatomen 2 und 2' der Seitenketten zweier Phenylpropaneinheiten entstehen<sup>75)</sup>, wurde vorgeschlagen, den irreführenden Ausdruck Flavonolignane durch Silymarine zu ersetzen, weil Verbindungen dieses Typs erstmalig in den Früchten von Silybum marianum aufgefunden wurden<sup>76)</sup>.

Eine Übersicht über den neuesten Stand der Chemie der bisher aufgeklärten Mariendistelinhaltstoffe ist in diesem Jahr erschienen<sup>76)</sup>. An dieser Stelle soll deshalb nur die Struktur der untersuchten Verbindungen wiedergegeben werden (Abb. 6). Die in der Abbildung aufgeführten Verbindungen Taxifolin, Quercetin und der Dehydroconiferylalkohol gehören nicht zur Gruppe der Silymarine.

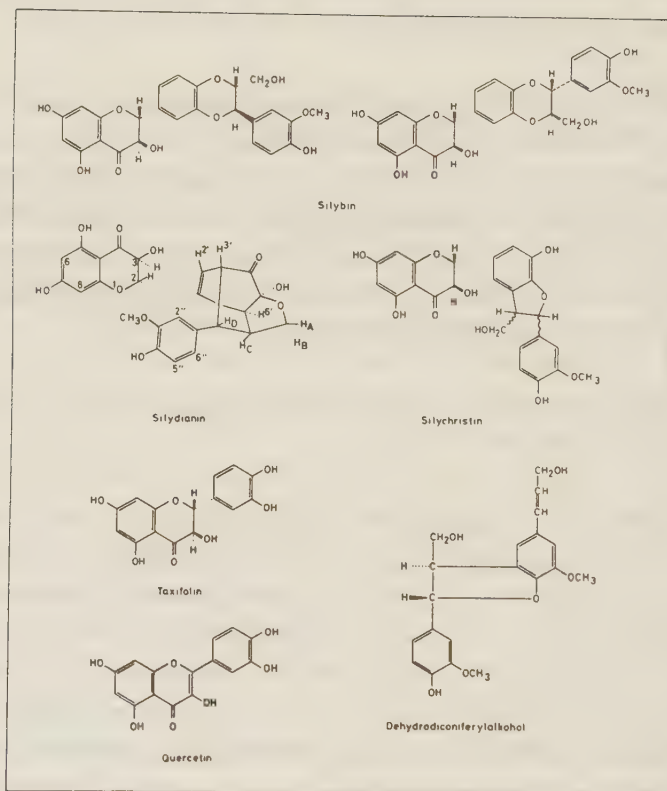


Abb. 6

Übersicht über die Inhaltsstoffe von *Fructus Silybi mariani*

Ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der Silymarine wurde von Raganathan und Seshadri in den Früchten von *Hydnocarpus wightiana* aufgefunden und als HYDNO-CARPIN bezeichnet<sup>77)</sup>. Hydnocarpin kann als Strukturanalogs des Silybins aufgefasst werden, in dem die Taxifolin-Grundstruktur durch Luteolin ersetzt ist.

Die bisher bekannten Silymarine lassen sich in folgender Systematik zusammenfassen:

Tabelle 2  
Systematik der Silymarine

| Typ:                                 | Flavanonoltyp | Flavonoltyp              | Flavontyp   |
|--------------------------------------|---------------|--------------------------|-------------|
| Coniferylalkohol<br>kondensiert mit: | Taxifolin     | Quercetin                | Luteolin    |
|                                      | Silybin       | Dehydro-<br>silybin      | Hydnocarpin |
|                                      | Silydianin    | Dehydro-<br>silychristin |             |
|                                      | Silychristin  |                          |             |

Die Verwendung der Silymarine als Leberschutztherapeutikum hat die Früchte von *Silybum marianum* als Arzneidroge wieder so aktuell gemacht, daß sie gute Aus-sichten hat, in die Europäischen Pharmakopöen und andere nationale Pharmakopöen aufgenommen zu werden. Dies verlangt nach einwandfreien Methoden zur chemi-schen Identitäts- und Reinheitsprüfung sowie zur Wertbestimmung der Droge und daraus hergestellten pharmazeutischen Zubereitungen.

## 5. ANALYTIK DER SILYMARINE

### 5.1. VORAUSSETZUNGEN FÜR DIE WERTBESTIMMUNG DER SILYMARINE DURCH DC-DIREKTAUSWERTUNG

Die bisher in der Literatur beschriebenen Wertbestimmungsverfahren stellen Gesamtbestimmungsverfahren dar<sup>78,79)</sup>. Lediglich von Halbach und Winkler<sup>80)</sup> werden Silybin und Silydianin durch DC-Direktauswertung der UV-Absorption bestimmt. Diese Arbeit konnte nicht als Grundlage für unsere eigenen Untersuchungen verwendet werden, da die beschriebene Methode der komplexen Zusammensetzung der Silymarine nicht gerecht wird.

#### 5.1.1. Auswahl des geeigneten Direktauswerteverfahrens

##### 5.1.1.1. Voruntersuchungen

Die DC-Direktauswertung kann unter Ausnutzung der UV-Absorption der Silymarine entweder durch Messung der Absorption oder der Fluoreszenzminderung erfolgen. Für die Ausnutzung der Fluoreszenz ist eine Umsetzung der Silymarine mit Detektionsreagentien unerlässlich. Dabei kann die Fluoreszenz aus einer Chelatbildung mit Metallatomen, wie z.B.  $\text{AlCl}_3$  resultieren<sup>81-83)</sup>. Sie ist mit einer bathochromen Verschiebung der Absorption verbunden.

Komplexe mit solchen Eigenschaften sind jedoch nicht auf Metalle als Komplexbildner beschränkt; das Nichtmetall Bor bildet ebenfalls Chelate, die zu einer Sekundäremission führen. Erstmals wurden Nachweise mit Bor von Wilson<sup>84)</sup> und Tauböck<sup>85)</sup> beschrieben. Man spricht heute allgemein vom Wilson-Tauböck-Test, obwohl neuere Untersuchungen von Langhammer und Hänsel<sup>86)</sup> gezeigt haben, daß es sich hinsichtlich Spezifität und Reaktionsmechanismus um zwei durchaus verschiedene Umsetzungen handelt.

Eine wesentliche Verbesserung dieses Testes wurde von Neu ausgearbeitet<sup>87)</sup>. Durch den Einsatz arylsubstituierter Borsäure konnte der Nachweis von Pyronen entscheidend verbessert werden. In einer Reihe ausführlicher Untersuchungen wurde von Neu dieses Detektionsverfahren<sup>87-97)</sup> studiert. Diphenylborsäure-β-aminoäthylester (Kurzbezeichnung DBAÄE), als Naturstoffreagenz nach Neu bekannt, zeichnet sich im Vergleich zu den anderen Arylborsäuren durch eine fast unbegrenzte Haltbarkeit aus.

Um zu entscheiden, welches Detektionsmittel für die anschließende fluorometrische Bestimmung der Silymarine am besten geeignet ist, haben wir identische Chromatogramme mit verschiedenen Fluoreszenzreagentien besprüht. Während Bleiacetat und Aluminiumchlorid auf Kieselgelschichten die einzelnen Zonen im UV-Licht nur unscharf und schwach sichtbar machten, erhielten wir beim Besprühen mit DBAÄE wesentlich bessere Ergebnisse.

Wir haben nachstehend folgende Meßmethoden miteinander verglichen:

- a) Messung der UV-Absorption
- b) Messung der Fluoreszenzminderung
- c) Messung der Fluoreszenz der Silymarin-DBAÄE-Chelate

Jede dieser Meßmethoden lässt sich sowohl in Transmissions- als auch in Remissionsanordnung durchführen.

Voraussetzung für den Vergleich dieser sechs Verfahren ist die Kenntnis der Remissionsspektren adsorbierter Silymarine bzw. der Spektren des Plattenindikators für die Fluoreszenzminderungsmessung.

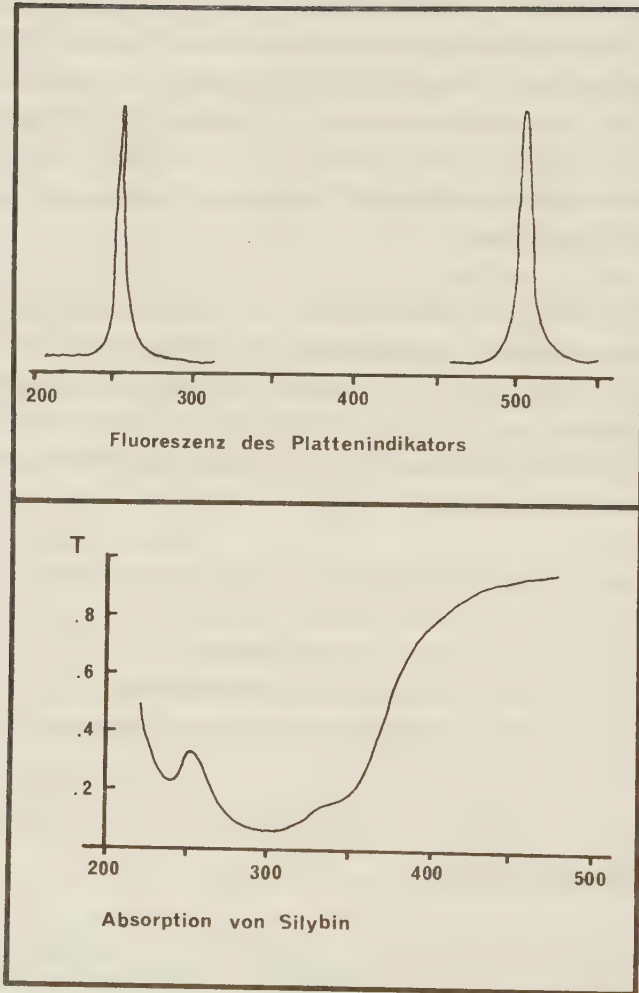


Abb. 7a  
Remissionsspektren

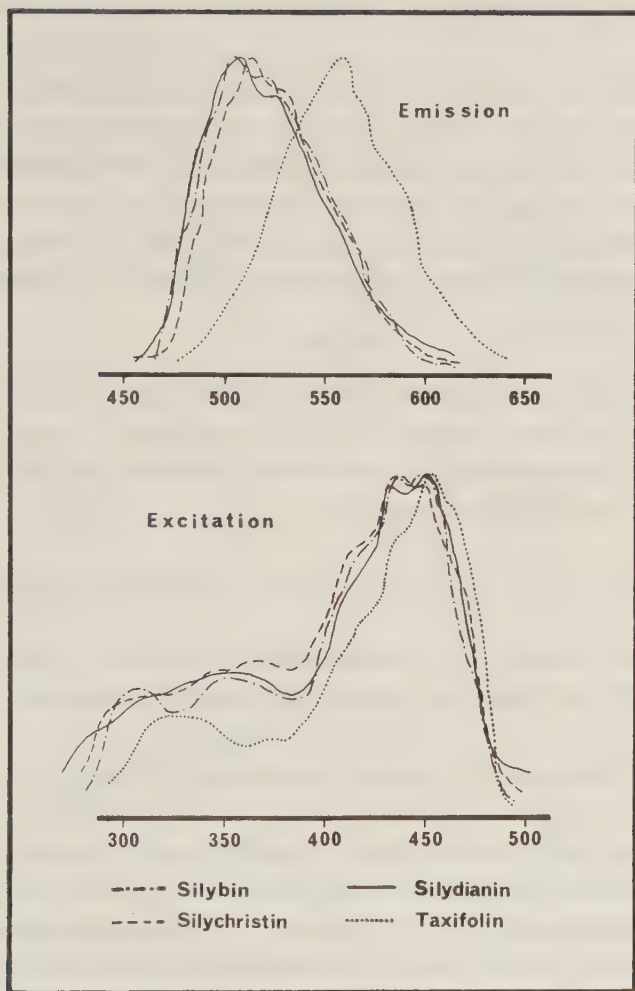


Abb. 7b

Remissionsspektren

#### 5.1.1.2. Aufnahme der Remissionsspektren

Die Aufnahme dieser Spektren erfolgt durch eine punktweise Ermittlung des Kurvenverlaufes, bei der eine unbeladene Plattenstelle als "Blindwert" dient und mit der Substanzzone verglichen wird. Die zweite Möglichkeit der Spektrenaufzeichnung, bei der das Substanzspektrum kontinuierlich aufgenommen wird und an Hand des in gleicher Weise registrierten Untergrundspektrums graphisch korrigiert wird, ist wesentlich ungenauer als die diskontinuierliche Aufnahme und wurde deshalb von uns nicht verwendet.

Das relative Absorptionsspektrum von Silybin, das sich mit dem der übrigen Hauptkomponenten deckt, zeigt die Abb. 7a. Daraus ist ferner zu ersehen, daß die zur Fluoreszenzminderungsmessung erforderliche Absorption im Bereich der Excitation des Plattenindikators vorhanden ist.

Abb. 7b zeigt die Remissionsspektren von Silybin, Silychristin und Taxifolin.

Die ermittelten Absorption-, Excitations- und Emissionsspektren dienen als Grundlage für den Vergleich der verschiedenen Direktauswerteverfahren.

#### 5.1.1.3. Vergleich der verschiedenen Direktauswerteverfahren

Aus den in der Abb. 8 wiedergegebenen Ortskurven geht eindeutig hervor, daß die beste Auflösung der Chromatogrammzonen durch die Fluoreszenzmessung in Remissionsanordnung erzielt wird. Die Substanzpeaks erreichen in ihren Minima die gedachte Null-Linie fast, womit eine wichtige Voraussetzung für die quantitative Bestimmung erfüllt wird. Wesentlich schlechtere Auflösungen erhält man bei Absorptionsmessungen und Messungen der Fluoreszenzminderung, da diese unspezifisch auch alle Begleit- und Ballaststoffe erfassen, deren Absorption im Meßbereich liegt.

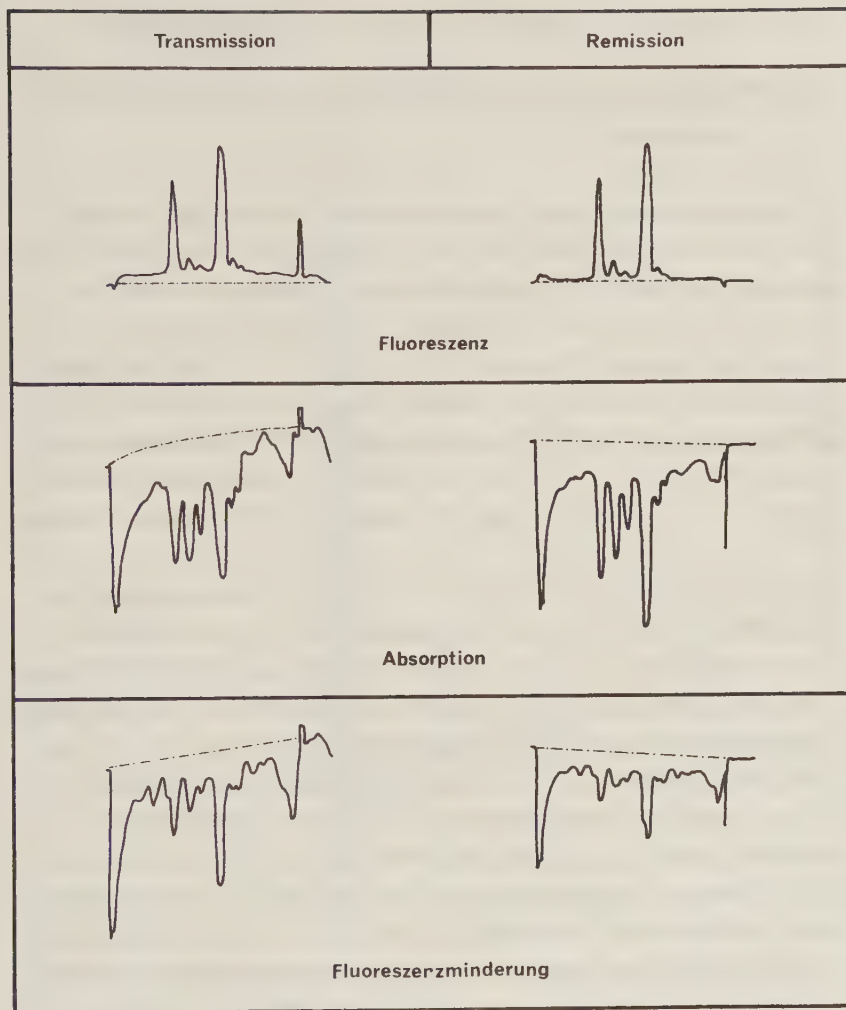


Abb. 8

Vergleich der Direktauswerteverfahren

### 5.1.2. Detektion der Silymarine mit Diphenylborsäure- $\beta$ -aminoäthylester

#### 5.1.2.1. Überprüfung der Proportionalität zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration

Die DC-Direktauswertung einer Konzentrationsreihe mit reinem Silybin ergab, daß bei der Detektion mit DBAÄE auf Kieselgel Mengen unter einem Mikrogramm nicht mehr fluorometrisch erfasst werden können. Im Bereich zwischen 1 und 50  $\mu\text{g}$  wurden die registrierten Peakflächen (F) der Ortskurven gegen die Konzentrationen (c) aufgetragen. Weder durch die Funktion  $F = f(c)$  noch durch andere Funktionen konnte eine Eichgerade aufgestellt werden. Übereinstimmend wird jedoch beschrieben, daß bei der Fluorometrie einfache Funktionen zwischen Konzentration und Peakfläche<sup>18, 25, 61)</sup> oder auch zwischen Konzentration und Peakhöhe bestehen<sup>27, 61, 72)</sup>, die unter günstigen Bedingungen durch den Ursprung verlaufen.

Die Form der von uns erhaltenen Eichkurve ließ vermuten, daß durch Konzentrationsquenching keine der Konzentrationszunahme proportionale Steigerung der Fluoreszenzintensität mehr erfolgt. Setzt man eine Normalverteilung der Substanz um den Fleckmittelpunkt voraus, so erfasst der Meßstrahl bei der Aufnahme einer Ortskurve Intensitäten, die von Null zu einem Maximum ansteigen und dann symmetrisch wieder abfallen. Bei einem Konzentrationsquenching müssen dann die Peakflanken noch eine proportionale Steigerung aufweisen, während die Maxima ineinandergeschoben werden. Dieser Effekt läßt sich an Hand der Darstellung einer Silybinkonzentrationsreihe gut zeigen (Abb. 9). Überschreitet die Konzentration im Fleckmittelpunkt einen bestimmten Wert, so nimmt die Intensität im Zentrum deutlich ab. In der Ortskurve wird das ursprüngliche Maximum in zwei Maxima aufgespaltet. Visuell ist dieser Vorgang an der Bildung eines dunklen Hofes im Zentrum einer Substanzzone zu erkennen. Quantitative Bestimmungen führen in diesen Konzentrationsbereichen zu keinen vernünftigen Ergebnissen. Betrachtet man in der Publikation von Klaus<sup>27)</sup> die Fig. 14 und Fig. 15, so kann man die Hofbildung bei einer Fluorescein-Na-Konzentrationsreihe deutlich ausgeprägt sehen. Die zugehörigen Ortskurven bestätigen die oben formulierten Zusammenhänge zwischen Konzentration und Ausbildung der Ortskurven.

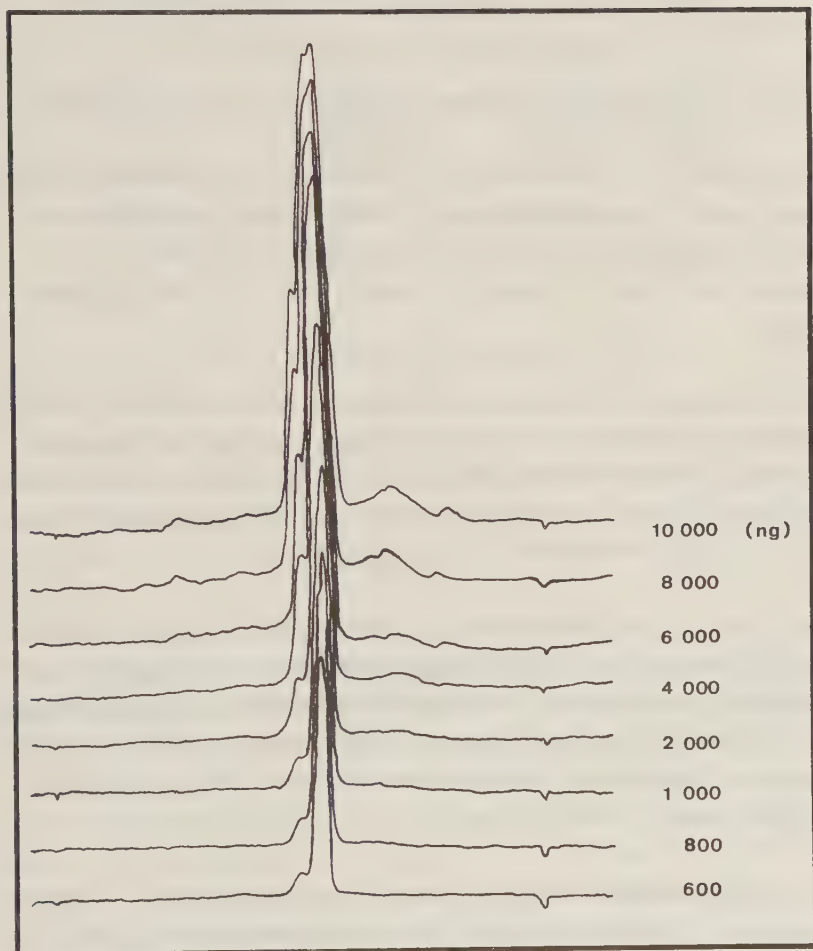


Abb. 9

Reliefdarstellung einer Silybin-Konzentrationsreihe

Zur Lösung dieses Problems musste die fluorometrische Bestimmung so verändert werden, daß im Nannogrammbereich noch exakt erfaßbare Fluoreszenzen erzeugt werden können.

#### 5.1.2.2. Modifizierung der Detektion mit Diphenylborsäure- $\beta$ -aminoäthylester

Chromatographische Untersuchungen auf verschiedenen stationären Phasen hatten gezeigt, daß die Nachweisempfindlichkeit für die Silymarine nach Detektion mit dem Naturstoffreagens auf Cellulose und Polyamid deutlich besser war als auf Kieselgel. Bei diesen verschiedenen stationären Phasen variieren die Sorptionskräfte.

Eine Schwächung der Adsorptionskräfte an Kieselgel müsste dann zu einer Verbesserung der Nachweisbarkeit führen. Deshalb übersprühten wir die Dünnschichtchromatogramme nach ihrer Entwicklung und Detektion mit DBAÄE mit einer äthanolischen Lösung von Polyäthylenglykol 4000. Polyäthylenglykole (PEG) sind als gute Lösungsmittel für phenolische Verbindungen bekannt.

Diese kombinierte Detektion führte tatsächlich zu einer signifikanten Verbesserung der Nachweisbarkeit. Darüber hinaus konnte noch eine Differenzierung der Fluoreszenzfarben beobachtet werden. Während nach dem Besprühen mit Naturstoffreagenz Taxifolin eine gelborange und die Silymarine eine gelblichgrüne Fluoreszenz zeigen, fluoreszieren die Silymarine nach der kombinierten Detektion intensiv grün und Taxifolin orange.

Die Nachweisempfindlichkeit für Silybin auf verschiedenen Sorbentien und unter variierenden Detektionsbedingungen wurde in einem Modellversuch ermittelt. 13 Konzentrationen, abgestuft von 1 - 1000 Nannogramm, wurden aufgetragen, entwickelt, detektiert und nach 1, 2, 5 und 24 Stunden im UV-Licht (366 nm) betrachtet. Die jeweils geringsten Mengen, die nachweisbar waren, gibt die Tabelle 3 wieder.

Tabelle 3

Nachweisgrenzen für Silybin auf verschiedenen stationären Phasen  
und unter variierenden Detektionsbedingungen

|           | Aluminium-<br>chlorid | Naturstoffreagenz |         |
|-----------|-----------------------|-------------------|---------|
|           |                       | ohne PEG          | mit PEG |
| Cellulose | 75 ng                 | 25 ng             | 7,5 ng  |
| Polyamid  | 75 ng                 | 10 ng             | 7,5 ng  |
| Kieselgel | 100 ng                | 10 ng             | 2,5 ng  |

#### 5.1.2.3. Untersuchung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit

Aluminiumchlorid erzeugt zwar rasch eine Fluoreszenz, doch nimmt diese auch wieder schnell ab. DBAÄE erfordert eine Ausgleichszeit von mehreren Stunden bis zum Erreichen der maximalen Fluoreszenz. Sie bleibt über Stunden unverändert, wenn die Platten unter Licht- und Luftausschluß aufbewahrt werden.

In einem weiteren Modellversuch wurde die Zeitabhängigkeit der Fluoreszenz bestimmt. Dazu wurden drei Substanzpunkte mit gleicher Konzentration aufgetragen, chromatographiert und verschieden detektiert. Fleck a wurde mit DBAÄE, Fleck b mit DBAÄE und PEG, und Fleck c mit den beiden Reagentien in umgekehrter Reihenfolge besprüht. Unmittelbar nach der Detektion positionierten wir die Platte so im Scanner, daß alle drei Flecke optimal vom Meßstrahl erfasst wurden. Danach wurde in Abständen die Fluoreszenzintensität registriert und die Zeit und Peakfläche digital vom Integrator bestimmt. In ein Zeit-Intensitäts-Diagramm übertragen ergibt sich der aus Abb. 10 zu ersiehende Kurvenverlauf.

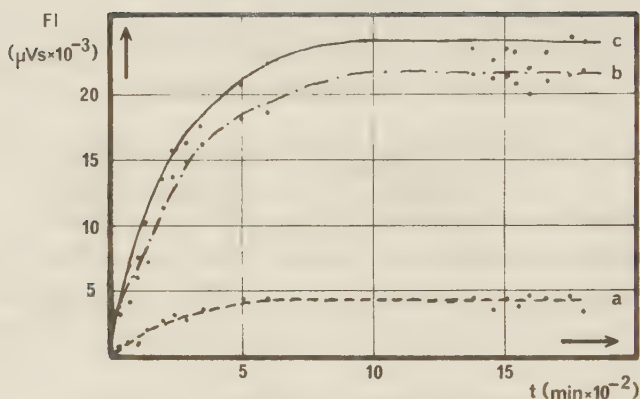


Abb. 10

## Zeit-Intensitäts-Diagramm der Fluoreszenz von Silybin

Man erkennt, daß die Fluoreszenzintensität in den ersten Stunden steil ansteigt, dann asymptotisch verläuft und im weiteren Untersuchungszeitraum nahezu konstant bleibt. Deshalb sollte zwischen der Detektion einer DC-Platte und ihrer Direktauswertung bei der Wertbestimmung der Silymarine eine Ausgleichszeit von mindestens zehn Stunden eingehalten werden, während der die Platte lichtgeschützt bei 20°C und 50% rel. Luftfeuchtigkeit aufbewahrt wird. Die Detektion wird - wie aus der Abb. 10 ebenfalls zu ersehen ist - durch Zusatz von Polyäthylenglykol wesentlich verbessert, wobei die Reihenfolge der Sprühvorgänge keinen entscheidenden Einfluß ausübt.

Für die beobachteten Erscheinungen können folgende Gründe verantwortlich sein:

- a) eine pH-Wert-Verschiebung
- b) eine Veränderung des Feuchtigkeitsgehalts
- c) eine Komplexbildung mit PEG
- d) eine Stabilisierung des Chelates durch PEG
- e) eine Desorption, die zu einer anderen räumlichen Anordnung am Sorbens führt und
- f) eine Desorption, die die Umsetzung der Detektionsreaktion verbessert.

- zu a) Der beobachtete Effekt steht nicht im Zusammenhang mit einer pH-Wert-Verschiebung, da das Besprühen mit Pufferlösungen zu keinem vergleichbaren Ergebnis führte.
- zu b) Wie Boulton <sup>59)</sup> nachweisen konnte, können Feuchtigkeitsgehalt des Sorbens und Fluoreszenzintensität miteinander korreliert sein. Im vorliegenden Fall führte die Detektion unter verschiedenen definierten Feuchtigkeitsbedingungen zu keiner Verbesserung der Detektion.
- zu c) Die Komplexbildung zwischen PEG und Silymarinen auf der Basis von Wasserstoffbrückenbildungen kann als gesichert angesehen werden. Eine Komplexbildung zwischen PEG und DBAÄE ist anzunehmen <sup>98)</sup>. Die nach der Detektion mit PEG und DBAÄE aufgezeichneten Fluoreszenzremissionsspektren stimmen mit den in Abb. 7b gezeigten Kuvenbildern überein.
- zu d) Eine Stabilisierung des gebildeten Chelates durch freie Elektronenpaare der Äthersauerstoffatome ist möglich. Neu berichtet bei seinen Untersuchungen mit Tetraphenyldiboroxyd über verstärkte Bathochromie und Fluoreszenz, wenn die Reaktion in Dimethylsulfoxyd durchgeführt wird, geht aber auf die genaueren Umstände nicht ein <sup>94)</sup>.
- zu e) Es ist vorstellbar, daß die Silymarinmoleküle im adsorbierten Zustand so verformt sind, daß die Ausbildung einer flächigen Struktur und damit auch die Fluoreszenz verhindert werden. Phenolphthalein fluoresziert im adsorbierten Zustand, in Lösung dagegen nicht. Hier wird die planare Struktur durch Adsorption an das Trägermaterial erzwungen. Fluorescein, das diese planare Struktur durch die Sauerstoffbrücke zwischen den beiden Phenylringen erhält, fluoresziert auch in gelöster Form <sup>99)</sup>.
- zu f) Aus den unter e) genannten Gründen ergibt sich noch eine zweite Interpretationsmöglichkeit. Durch die zur Adsorption an die aktiven Zentren konkurrierende Desorption und die damit verbundene andere räumliche Anordnung der Silymarinmoleküle am Sorbens können die komplexbildenden Zentren für das Detektionsmittel besser zugänglich sein. In diesem Fall ist mit einer erhöhten Reaktivität auch eine größere Fluoreszenzintensität verbunden.

Vermutlich ist der beobachtete Effekt nicht auf einen bestimmten Mechanismus zurückzuführen, sondern Folge mehrerer synergistischer Prozesse.

### 5.1.3. Zur Qualitätsbeurteilung der fluorometrischen Direktauswertung

Eine wichtige Voraussetzung für die quantitative Bestimmung der Silymarine ist die Untersuchung der Präzision, mit der Teilbereiche und zusammenhängende Operationen der fluorometrischen DC-Direktauswertung durchgeführt werden können. Alle grundlegenden Angaben für die Qualitätskontrolle gepaarter und ungepaarter Meßwerte sind den Standardwerken der Statistik zu entnehmen<sup>100, 101, 102)</sup>.

#### 5.1.3.1. Präzision der Peakflächenmessung

Ziel der ersten Untersuchung war es, die Präzision der Registrierung einer Substanzzone zu bestimmen. Ein DC-Fleck wurde im Meßstrahl einjustiert. Danach wurde durch den automatischen Plattenvorschub der Fleck zwanzigmal - abwechselnd in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung - abgetastet und die registrierte Fluoreszenzortskurve elektronisch ausgewertet.

Tabelle 4  
Präzision der Flächenbestimmung

|           | 10 Scans in<br>Vorwärtsrichtung | 10 Scans in<br>Rückwärtsrichtung | 20 Scans in<br>beiden Richtungen |
|-----------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| $\bar{x}$ | 14,989                          | 15,079                           | 15,034                           |
| s         | 0,19619                         | 0,11910                          | 0,16447                          |
| $s_s$     | 0,04387                         | 0,02663                          | 0,02600                          |
| v         | 1,31%                           | 0,79%                            | 1,09%                            |
| $s_v$     | 0,29%                           | 0,18%                            | 0,17%                            |

(Anmerkung: Die in dieser und in den folgenden Tabellen verwendeten Abkürzungen und die diesen Buchstaben entsprechenden statistischen Formeln werden im ANHANG 1 wiedergegeben, die Zahlenwerte für diese Meßreihen im ANHANG 2 aufgeführt)

In der Praxis ist es erforderlich, einen DC-Fleck mehrmals neu einzujustieren. Man erhöht damit nicht nur die Genauigkeit der Flächenbestimmung, sondern auch die Richtigkeit der Fleckbestimmung. Zu diesem Zweck wird der Fleck in beiden Koordinatenachsen auf Maximum abgeglichen, auf die Startposition zurückgebracht und dann in der Richtung des automatischen Plattenvorschubs vermessen.

Tabelle 5

## Präzision der DC-Fleckbestimmung

| 10 unabhängige Fleckmessungen |         |
|-------------------------------|---------|
| $\bar{x}$                     | 15,426  |
| s                             | 0,13967 |
| $s_s$                         | 0,03123 |
| v                             | 0,91%   |
| $s_v$                         | 0,20%   |

Mit einem Variabilitätskoeffizienten (v) von etwa 1% ist eine gute Reproduzierbarkeit gewährleistet.

## 5.1.3.2. Präzision der Bestimmungsmethode im Modellversuch

In einem Modellversuch wurden achtmal 50  $\mu$ l Silybinlösung (= 600 ng) aufgetragen, chromatographiert, detektiert und ausgewertet. Zur Applikation der Untersuchungslösung verwendeten wir den TLC-Multi-Spotter (Fa. Unimetrics, vertr.dch. Fa. Macherey u. Nagel).

Tabelle 6  
Präzision im Modellversuch

|           | 8 Bahnen | 6 Bahnen (ohne Außenbahnen) |
|-----------|----------|-----------------------------|
| $\bar{x}$ | 14,705   | 14,423                      |
| s         | 0,64839  | 0,46640                     |
| $s_s$     | 0,09359  | 0,07773                     |
| v         | 4,41%    | 3,23%                       |
| $s_v$     | 0,64%    | 0,54%                       |

Für diese Untersuchung ergibt sich ein Variabilitätskoeffizient (v) von 4,41%. Darin sind die Fehler eingeschlossen, die durch Auftragung, Entwicklung, Detektion und den eigentlichen Meßvorgang der Direktauswertung auftreten. Es zeigt sich dabei, daß die Wertegruppen für die äußeren Bahnen abweichen, was wir auf die unterschiedliche Ausbildung der DC-Flecke im Vergleich zu den inneren Bahnen zurückführen. Als Ursache für diese Abweichung konnten wir eine ungleichmäßige Detektion und unterschiedliche Erwärmung beim Trocknen der DC-Platte ausschließen. Wie aus den Vergleichswerten für die inneren 6 Flecke zu ersehen ist, könnte die Präzision durch den Verzicht auf die äußeren Bahnen verbessert werden. Der Effekt ist jedoch zu gering, um eine Verminderung der Analysenanzahl aufzuwiegen.

#### 5.1.3.3. Korrelation und Regressionsgerade im Modellversuch

An Hand einer Konzentrationsreihe von 100 - 1000 ng Silybin haben wir die Korrelation der Meßwertpaare überprüft und die Regressionsgerade aufgestellt:

$$\begin{aligned}
 r &= 0,995 \\
 T &= 29,117 \\
 k &= -1,12050 \\
 b &= 0,0128721
 \end{aligned}$$

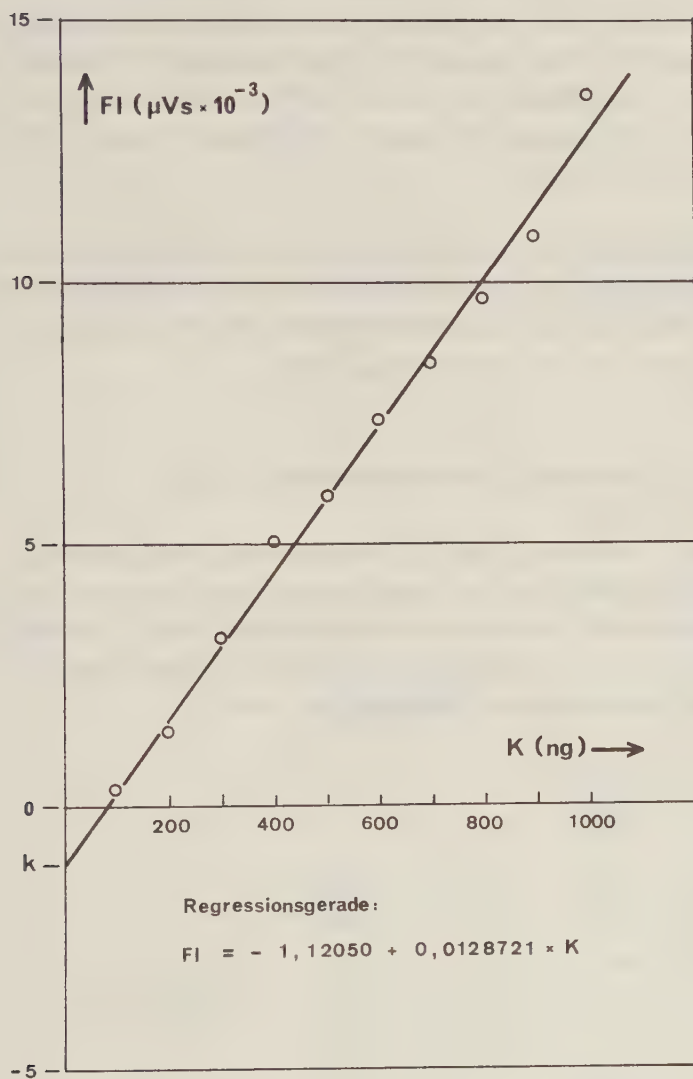


Abb. 11

Regressionsgerade einer Silybin-Konzentrationsreihe

In Abb. 11 werden die Meßwertepaare im Koordinatensystem dargestellt. Die eingezeichnete Gerade ist die oben mit  $k$  und  $b$  beschriebene Regressionsgerade. Wie man erkennen kann, erhält man durch die rechnerisch aufgestellte Funktion einen optimalen Zusammenhang zwischen gemessener Fluoreszenzintensität und der Konzentration. Im Folgenden wird deshalb auf die graphische Lösung von Eichfunktionen völlig verzichtet.

Die Wertepaare sind untereinander sehr gut korreliert ( $r = 0,995$ ). Ein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration ist damit bewiesen. Die Gerade läuft nicht durch den Achsenschnittpunkt, was auf einen konstanten Anteil deutet, der sich der Bestimmung entzieht.

#### 5.1.4. Zur Dünnschichtchromatographie der Silymarine

Eine weitere Voraussetzung jeder DC-Direktauswertung ist eine einwandfreie chromatographische Trennung der wesentlichen Inhaltsstoffe des zu untersuchenden Pflanzenextrakts. Die zu bestimmenden Substanzpeaks sollen bei der Direktauswertung die Grundlinie erreichen, damit elektronische Integrationssysteme zur exakten Flächenbestimmung eingesetzt werden können.

## 5.1.4.1. Bisherige chromatographische Verfahren

Tabelle 7  
Bisherige Trennverfahren für Silymarine

| Nr. | Sorbens        | Detektion                                        | Laufmittel                                                            | Autor                                                                                                     |
|-----|----------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | Papier         | Bas.Bleiazetat,<br>Aluminiumchlorid,             | Butanol:Eisessig:<br>Wasser = 4:1:5                                   | Wagner H., Hörhammer<br>L.u.Münster R.,<br>Arzneim.Forsch.                                                |
| 2   |                | Rhodamin B +<br>Ammoniak 25%,<br>Magnesiumacetat | Isopropanol:Wasser<br>= 2:3                                           | <u>18</u> , 688, (68)                                                                                     |
| 3   |                |                                                  | Eisessig:Wasser<br>= 15:85                                            |                                                                                                           |
| 4   |                |                                                  | Pyridin:Wasser<br>= 3:7                                               |                                                                                                           |
| 5   |                |                                                  | Isopropanol:Ameisen-<br>säure:Wasser = 2:5:5                          |                                                                                                           |
| 6   | Kiesel-<br>gel | ---                                              | Benzol:Methanol:<br>Essigester = 95:2:13                              | Hänsel R., Schulz I.,<br>Pelter A., Rimpler H.<br>u. Rizk A.F., Tetraedr.<br>Lett. <u>51</u> , 4417, (69) |
| 7   | Poly-<br>amid  | 4-Methoxy-2-<br>nitroanilin                      | Chloroform:Methanol:<br>Methyläthylketon<br>= 60:14:26                | Lipfert R. u. Honer-<br>lagen H., Dtsch. Apothe-<br>ker Z., <u>110</u> , 873, (70)                        |
| 8   |                |                                                  | Wasser:Äthanol:<br>Methyläthylketon:<br>Acetylacetone<br>= 65:15:15:5 |                                                                                                           |
| 9   | Poly-<br>amid  | ---                                              | Chloroform:Methyl-<br>äthylketon:Methanol<br>= 60:20:14               | Wagner H., Seligmann O.,<br>Hörhammer L.u. Seitz M.,<br>Tetraedr. Lett. <u>22</u> , 1895,<br>(71)         |
| 10  | Poly-<br>amid  | ---                                              | Chloroform:Methyl-<br>äthylketon:Methanol<br>= 70:20:7                | Halbach G.u. Winkler W.,<br>Z. Naturforsch. <u>26b</u> , 971,<br>(71)                                     |
| 11  | Kiesel-<br>gel | 2,4-Dinitro-<br>phenylhydrazin                   | Tetrachlorkohlenstoff:<br>Acetonitril = 1:1                           | Halbach G.u. Görler K.,<br>Planta med. <u>19</u> , 293, (71)                                              |
| 12  | Poly-<br>amid  | " , AlCl <sub>3</sub> ,<br>Rhodamin B            | Chloroform:Methyl-<br>äthylketon:Methanol<br>= 60:26:14               |                                                                                                           |
| 13  | Papier         | diaz. Sulfanil-<br>säure                         | Eisessig:Wasser<br>= 15:85                                            | Janiak B.u.a.,<br>Arzneim.Forsch.<br><u>23</u> , 9, (73)                                                  |

Die bisher in der Literatur beschriebenen Systeme zur Trennung der Silymarine (s. Tab. 7) erfüllen die hohen Anforderungen für die Direktauswertung nicht.

#### 5.1.4.2. Entwicklung eines neuen chromatographischen Verfahrens als Voraussetzung der DC-Direktauswertung

Zur Entwicklung eines besseren chromatographischen Verfahrens haben wir eigene systematische Untersuchungen durchgeführt:

##### a) Modifizierung bestehender Verfahren

An Hand der von Neher aufgestellten äquielutropen Reihen (s. Geiss<sup>103</sup>) wurden in den bekannten Laufmitteln Komponenten ausgetauscht, um so zu einer besseren Selektivität zu gelangen. Die Versuche auf dieser Basis führten nicht zu dem gewünschten Resultat.

##### b) Einphasensysteme

Auf Kieselgel als Sorbens wurden Extrakte mit reinen Laufmitteln entwickelt. Chloroform transportierte die Silymarine nicht, in Aceton war das Gleichgewicht zugunsten der mobilen Phase verschoben.

##### c) Zweiphasensysteme

Es lag nahe, die beiden Komponenten zu einem binären System zu kombinieren. Eine Mischung gleicher Volumenteile führte zwar zu einer diffusen Trennung, die Zonen überlappten sich jedoch. Durch Variation des Mengenverhältnisses konnte keine Verbesserung erreicht werden.

##### d) Dreiphasensystem

Fleckschleppen und überlappende Zonen treten außer aus den bereits erwähnten Gründen vor allem durch Dissoziationsgleichgewichte auf, die zu unterschiedlichen

Verteilungsfunktionen der Substanzen zwischen mobiler und stationärer Phase führen. Die Dissoziation der Polyphenole kann durch Zusatz von Ameisensäure zum Laufmittel zurückgedrängt werden. Auf Kieselgel, aber auch auf anderen stationären Phasen, ergeben sich nach Zusatz von Ameisensäure scharfe DC-Zonen. Um die Gesamtpolarität des Laufmittels zu erhalten, mussten die Mengenverhältnisse von Chloroform und Aceton geändert werden. Als optimale Abstufung der drei Fließmittelbestandteile ergab sich:

$$\text{Chloroform : Aceton : Ameisensäure} = 9 : 2 : 1 \text{ (V/V/V)}$$

Die Erhöhung bzw. Erniedrigung der Konzentration jeweils einer Komponente führte zu keiner weiteren Verbesserung mehr.

Die Lage der einzelnen Silymarine in diesem System gibt das nachstehende Schema wieder.

Sorbens: Kieselgel-60-Fertigplatte  
 Laufmittel: Chloroform:Aceton:Ameisensäure = 9:2:1  
 Sättigung: 24 h  
 Entwicklung: 2 x 15 cm

Abkürzungen:

|       |                       |
|-------|-----------------------|
| DHSB  | Dehydrosilybin        |
| DHISB | Dehydroisosilybin (?) |
| SB    | Silybin               |
| ISB   | Isosilybin (?)        |
| SD    | Silydianin            |
| TF    | Taxifolin             |
| FX    | Flavon X (?)          |
| SC    | Silychristin          |
| SBN   | Silybinomer           |

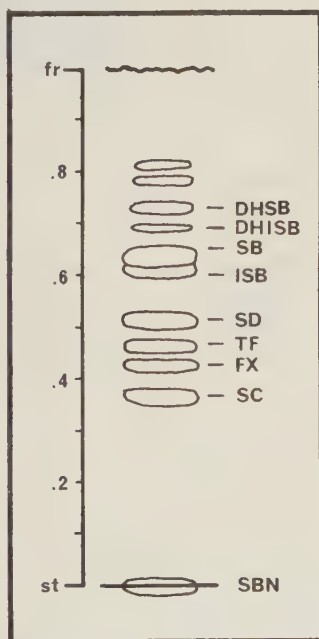
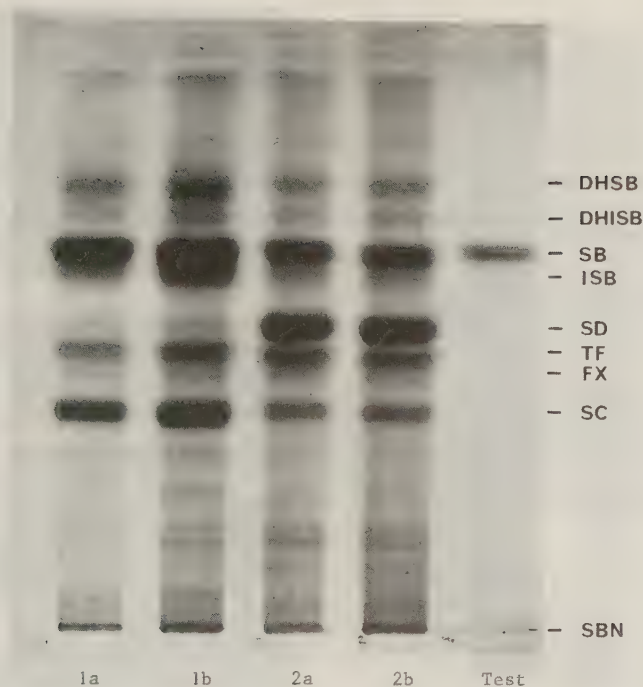


Abb. 12

Dünnschichtchromatogramm der Silymarine

Die in den nächsten Abbildungen gezeigten Photographien lassen deutlich den unterschiedlichen Gehalt an Silydianin in den verschiedenen Extrakten erkennen (Abb. 13). Die Farbunterschiede in der Fluoreszenz der Silymarine (grüngelb) im Gegensatz zu Taxifolin (orange) sind in der Schwarz-Weiß-Wiedergabe nicht zu erkennen. Dagegen kann man aus der Abbildung 13c entnehmen, daß die Fluoreszenz von Silydianin nicht so intensiv ist wie die der übrigen Silymarine. Diese Tatsache sollte für die Absolutbestimmung des Silydianins eine wichtige Rolle spielen.



|               |                                           |
|---------------|-------------------------------------------|
| Sorbens :     | Kieselgel 60-Fertigplatte                 |
| Laufmittel :  | Chloroform:Aceton:Ameisensäure = 9:2:1    |
| Sättigung :   | 24 Stunden                                |
| Entwicklung : | 2 x 15 cm                                 |
| Detektion :   | Fluoreszenzminderung (254 nm)             |
| Abkürzungen : | 1a Drogenextrakt der Fa.K. 1,0fache Konz. |
|               | 1b Drogenextrakt der Fa.K. 1,5fache Konz. |
|               | 2a Drogenextrakt der Fa.B. 1,0fache Konz. |
|               | 2b Drogenextrakt der Fa.B. 1,5fache Konz. |
|               | Test Silybin (isoliert)                   |
| DHSB          | Dehydrosilybin                            |
| DHISB         | Dehydroisosilybin (?)                     |
| SB            | Silybin                                   |
| ISB           | Isosilybin (?)                            |
| SD            | Silydianin                                |
| TF            | Taxifolin                                 |
| FX            | "Flavon X" (?)                            |
| SC            | Silychristin                              |
| SBN           | Silybinomer                               |

Abb. 13a

DC-Vergleich von Mariendistelextrakten

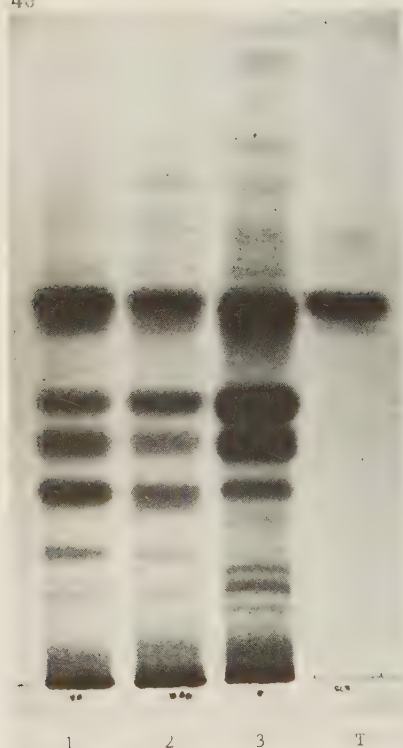


Abbildung 13 b



Abbildung 13 c

|               |                                                                                                      |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sorbens :     | Kieselgel 60-Fertigplatte                                                                            |
| Laufmittel :  | Chloroform:Aceton:Ameisensäure = 9:2:1                                                               |
| Sättigung :   | eine Sättigung erfolgte nicht                                                                        |
| Entwicklung : | 1 x 15 cm                                                                                            |
| Detektion :   |                                                                                                      |
| a) Abb. 13 b  | Fluoreszenzminderung (254 nm)                                                                        |
| b) Abb. 13 c  | Fluoreszenz im UV-Licht (366 nm) nach Besprühen mit<br>Naturstoffreagenz und Polyäthylenglykol 4 000 |
| Abkürzungen : |                                                                                                      |
| 1             | Drogenextrakt der Fa. M.                                                                             |
| 2             | Drogenextrakt der Fa. F.                                                                             |
| 3             | Drogenextrakt der Fa. B.                                                                             |
| T             | Test, Silybin, rein, krist., Fa. Bero-Chemie                                                         |

Abb. 13b und 13c

DC-Vergleich von Mariendisteleextrakten

## 5.1.4.3.      Einfluß der Kammersättigung auf das Trennergebnis

Bei der Erprobung des Fließmittelsystems zeigte sich sehr deutlich, daß die Sättigungsbedingungen einen starken Einfluß auf die Lage der Silymarine im Chromatogramm haben. Dieser Zusammenhang wird in der Tabelle 8 wiedergegeben. Außerdem lassen sich diese Unterschiede auch an den Abbildungen 13a und 13b, c, erkennen.

| Rf-Werte :                      | SILYDIANIN | SILYCHRISTIN | SILYBIN |
|---------------------------------|------------|--------------|---------|
| Sättigungszeit (h)              |            |              |         |
| 0                               | 0,35       | 0,46         | 0,57    |
| 3                               | 0,30       | 0,49         | 0,59    |
| 17 <sup>+) </sup>               | 0,25       | 0,32         | 0,42    |
| Einfachent - 24 <sup>+) </sup>  | 0,23       | 0,31         | 0,40    |
| wicklung                        | 0,08       | 0,09         |         |
| Zweifachent - 24 <sup>+) </sup> | 0,41       | 0,54         | 0,65    |
| wicklung                        | 0,13       | 0,65         |         |

<sup>+)</sup>  Entwicklungskammer mit Faservlies ausgekleidet

Tabelle 8  
Einfluß von Kammersättigung und Mehrfachentwicklung  
auf die Rf-Werte der Silymarine

## 5.1.4.4.      Einfluß der Mehrfachentwicklung auf das Trennergebnis

Als Ergänzung zu den vorstehenden Untersuchungen haben wir noch die Einfachentwicklung mit der Zweifachentwicklung verglichen. Dabei zeigte sich, daß die Zweifachentwicklung bei hoher Kammersättigung der Einfachentwicklung überlegen ist. Diesen Sachverhalt gibt die Abb. 14 wieder. Die gezeigten Ortskurven wurden von einer Platte aufgenommen, die einmal entwickelt wurde (hohe Kammer-

sättigung), deren zweite Hälfte dann abgetrennt und im gleichen Entwicklungstank nochmals entwickelt wurde. Die Lokalisation des Taxifolins kann an Hand der gestrichelten Ortskurve vorgenommen werden, die mit der für Taxifolin günstigeren Emissionswellenlänge von 560 nm aufgezeichnet wurde.

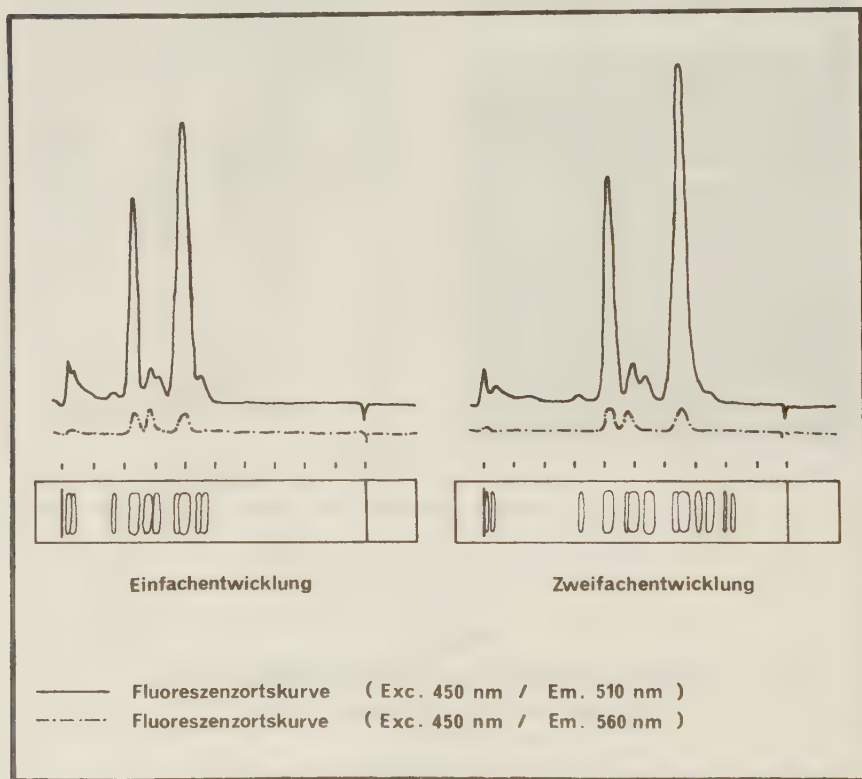


Abb. 14

Vergleich zwischen Einfach- und Zweifachentwicklung

Für die Dünnschichtchromatographie gilt Folgendes:

- a) Die DC der Silymarine erfolgt zweckmäßig auf Kieselgel im System Chloroform:Aceton:Ameisensäure = 9:2:1.
- b) Für qualitative Untersuchungen empfiehlt sich eine Zweifachentwicklung bei hoher Kammersättigung.
- c) Die quantitative DC-Direktauswertung erfordert reproduzierbare Rf-Werte; man entwickelt die Chromatogramme dafür deshalb nur einmal in einer Kammer ohne Sättigung.

## 5.2. BEZUGSSYSTEM DER SILYMARIN-WERTBESTIMMUNG

### 5.2.1. Silybin als Referenzsubstanz

Obwohl grundsätzlich eine Absolutbestimmung jeder Silymarinkomponente durchgeführt werden kann, ist für die Praxis der Bezug auf Silybin wünschenswert. Silybin kann von allen Silymarinen am leichtesten in der erforderlichen Reinheit isoliert werden, da es die Hauptkomponente des Silymarinkomplexes ist. Ein auf Silybin bezogener Gehalt entspricht damit auch weitgehend dem wirklichen Gehalt. Hinsichtlich ihrer Detektionsreaktion zeigen die Silymarine - die untereinander strukturisomer sind - gleiches Verhalten. Wie aus Abb. 7b hervorgeht, stimmen sie auch in ihren Fluoreszenzremissionsspektren gut überein. Außerdem gehen die heute gebräuchlichen Gesamtbestimmungsverfahren für Silymarine<sup>78,79)</sup> ebenfalls von Silybin als Standard aus.

Darüber hinaus wurden die meisten pharmakologischen Untersuchungen nur mit reinem Silybin durchgeführt. Halbach und Trost<sup>104)</sup> haben in der jüngsten Zeit verschiedene Silymarine und deren Umwandlungsprodukte analysiert. In Übereinstimmung mit der großen chemischen Ähnlichkeit fanden sie für Silybin, Silydianin und Silychristin eine gleiche qualitative pharmakologische Wirkung. Allein die Dehydrierung zum 2,3-Dehydrosilybin führt zu einer erheblichen Senkung der Wirksamkeit.

Für eine praxisgerechte Wertbestimmungsmethode ist daher die Standardisierung der Mariendistelextrakte durch Silybin zweckmäßig.

#### 5.2.2. Absolutbestimmung von Silydianin

Wie bereits beschrieben, weicht Silydianin in seiner Fluoreszenzintensität von den übrigen Silymarinen ab. Wir haben deshalb unter verschiedenen Sättigungsbedingungen zwei DC angefertigt, darauf durch DC-Direktauswertung Silybin und Silydianin absolut bestimmt und daraus einen Korrekturfaktor ermittelt, der angibt, wievielfach größer die absolute Silydianinkonzentration verglichen mit der auf Silybin bezogenen relativen Silydianinkonzentration ist.

$$\frac{K_{\text{Silydianin}}}{K_{\text{Silybin}}} = 5,7$$

Die Verwendung des Korrekturfaktors ist für Vergleiche mit anderen Bestimmungsmethoden erforderlich. Für alle fluorometrischen Direktauswerteverfahren ist sie nicht nötig, da relative Gehaltsangaben zu einer vergleichenden Beurteilung ausreichen. Weitaus größere Abweichungen gegenüber anderen Bestimmungsmethoden ergeben sich durch den Silybinomeranteil, der fluorometrisch nicht bestimmt werden kann.

#### 5.3. FLUOROMETRISCHE WERTBESTIMMUNG VON SILYMARINEN IN DROGENMUSTERN UND ARZNEISPEZIALITÄTEN

Um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit für die Bestimmung der Hauptkomponenten Silybin, Silydianin und Silychistin zu gewährleisten, wurde auf eine Trennung aller Silymarine verzichtet. Die DC wurde im ungesättigten Entwicklungstank durch eine Eintrennung ausgeführt. Zwischen Taxifolin und "Flavon X" einerseits und Silybin und "Isosilybin" andererseits kann deshalb nicht differenziert werden.

In der folgenden Abb. 15 werden die Ortskurven von vier Extrakten von *Silybum marianum* G. unterschiedlicher Provenienz wiedergegeben. Diese Ortskurven zeigen deutlich die Variationsmöglichkeiten in den Relationen der Silymarine. In der Tabelle 8 sind die Ergebnisse der fluorometrischen Silymarin-Wertbestimmung zusammengefasst.

Um einen Überblick über die natürliche Schwankungsbreite im Gehalt der einzelnen Silymarine in Mariendistel Früchten zu erhalten, haben wir 17 Drogenmuster unterschiedlicher Provenienz untersucht. Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der vorgeschlagenen Wertbestimmungsmethode für Silymarine wurden zwei Arzneispezialitäten in die Untersuchung miteinbezogen. Die Gehaltsangaben in dieser Tabelle erfolgen bei den Drogen in Prozent, bezogen auf die nicht entfettete Droge, und bei den Spezialitäten in mg/Dosis.

Die Resultate geben jeweils den Mittelwert aus drei Bestimmungen der Untersuchungslösung auf einer DC-Platte wieder. Unter 17a ist eine Doppelbestimmung angegeben, die von der Droge ausgehend durchgeführt wurde. Dabei sind Extraktion, Auftragung, Entwicklung, Detektion und Direktauswertung bei beiden Bestimmungen voneinander unabhängig.

Die allgemeine Berechnungsgrundlage, die diesen Bestimmungen zugrunde liegt, wird im Anhang 3 wiedergegeben.

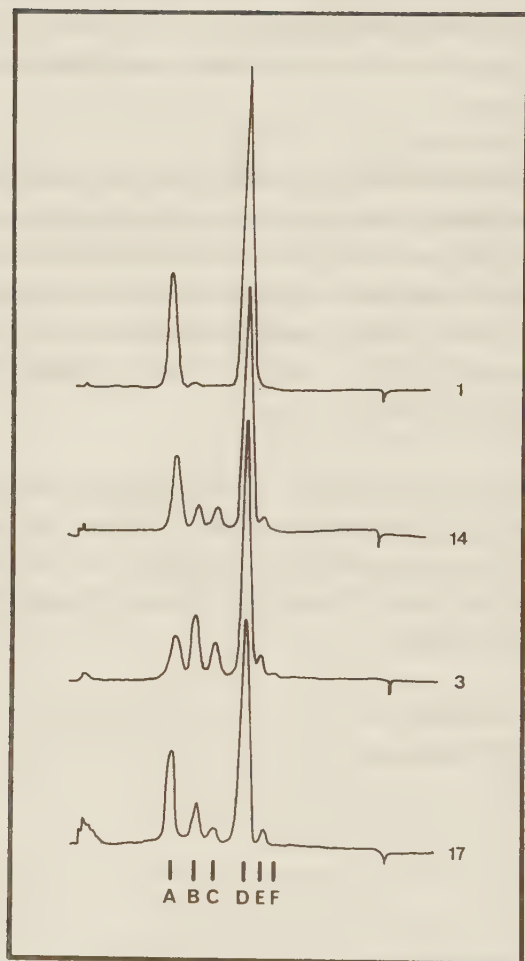


Abb. 15

Ortskurven einiger quantitativ bestimmter Mariendistelextrakte

Tabelle 9  
Ergebnisse der Silymarin-Wertbestimmung

| Komponenten :               | Prozentgehalt in der Droge |       |       |       |       |       |
|-----------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Drogennummer                | 1                          | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
| petrolätherlöslicher Anteil | 17,30                      | 26,90 | 23,70 | 23,88 | 22,70 | 25,70 |
| methanollöslicher Anteil    | 11,89                      | 13,64 | 12,38 | 9,46  | 12,62 | 12,51 |
| Silychristin                | 0,86                       | 1,25  | 0,42  | 0,50  | 0,92  | 0,94  |
| Taxifolin + "Flavon X" (?)  | 0,34                       | 0,35  | 0,48  | 0,44  | 0,36  | 0,31  |
| Silydianin                  | 0,00                       | 0,26  | 0,39  | 0,43  | 0,00  | 0,25  |
| Silybin + Isosilybin (?)    | 1,84                       | 1,82  | 1,08  | 1,14  | 1,57  | 1,81  |
| Dehydroisosilybin (?)       | 0,00                       | 0,28  | 0,31  | 0,27  | 0,00  | 0,25  |
| Dehydrosilybin              | 0,00                       | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| Silymarine (gesamt)         | 3,04                       | 3,96  | 2,68  | 2,78  | 2,85  | 3,56  |
| Drogennummer                | 7                          | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
| petrolätherlöslicher Anteil | 19,80                      | 20,98 | 22,26 | 21,04 | 24,88 | 23,60 |
| methanollöslicher Anteil    | 11,24                      | 10,81 | 12,38 | 11,21 | 10,69 | 11,18 |
| Silychristin                | 0,69                       | 0,67  | 0,51  | 0,65  | 0,76  | 0,79  |
| Taxifolin + "Flavon X" (?)  | 0,36                       | 0,30  | 0,28  | 0,34  | 0,23  | 0,33  |
| Silydianin                  | 0,00                       | 0,00  | 0,30  | 0,26  | 0,00  | 0,29  |
| Silybin + Isosilybin (?)    | 1,28                       | 1,38  | 1,30  | 1,24  | 1,39  | 1,38  |
| Dehydroisosilybin (?)       | 0,33                       | 0,26  | 0,26  | 0,25  | 0,17  | 0,32  |
| Dehydrosilybin              | 0,00                       | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| Silymarine (gesamt)         | 2,66                       | 2,61  | 2,65  | 2,74  | 2,75  | 3,11  |

| Komponenten :               | Prozentgehalt in der Droge |       |       |       |       |          |
|-----------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|----------|
| Drogennummer                | 13                         | 14    | 15    | 16    | 17    | ( 17 a ) |
| petrolätherlöslicher Anteil | 24,83                      | 23,50 | 22,90 | 24,90 | 24,50 | (23,65)  |
| methanollöslicher Anteil    | 11,03                      | 10,93 | 9,90  | 10,38 | 11,23 | (12,21)  |
| Silychristin                | 0,94                       | 0,71  | 0,61  | 0,69  | 0,84  | ( 0,82)  |
| Taxifolin + "FlavonX" (?)   | 0,41                       | 0,49  | 0,43  | 0,47  | 0,40  | ( 0,41)  |
| Silydianin                  | 0,00                       | 0,47  | 0,42  | 0,35  | 0,36  | ( 0,35)  |
| Silybin + Isosilybin (?)    | 1,49                       | 1,45  | 1,21  | 1,25  | 1,50  | ( 1,60)  |
| Dehydroisosilybin (?)       | 0,00                       | 0,41  | 0,36  | 0,00  | 0,35  | ( 0,35)  |
| Dehydrosilybin              | 0,00                       | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | ( 0,00)  |
| Silymarine (gesamt)         | 2,84                       | 3,53  | 3,03  | 2,76  | 3,45  | ( 3,53)  |

| Komponenten :               | Gehalt in Arzneispezialitäten |                  |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------|
| Spezialitätenbezeichnung    | I    +)                       | II   ++)         |
| petrolätherlöslicher Anteil | 42,04 %                       | -----            |
| methanollöslicher Anteil    | 26,56 %                       | -----            |
| Silychristin                | 3,88 mg / Dosis               | 4,77 mg / Dosis  |
| Taxifolin + "Flavon X" (?)  | 0,94 mg / Dosis               | 1,00 mg / Dosis  |
| Silydianin                  | 0,56 mg / Dosis               | 1,04 mg / Dosis  |
| Silybin + Isosilybin (?)    | 7,48 mg / Dosis               | 11,11 mg / Dosis |
| Dehydroisosilybin (?)       | 0,80 mg / Dosis               | 0,85 mg / Dosis  |
| Dehydrosilybin              | 0,53 mg / Dosis               | 0,00 mg / Dosis  |
| Silymarine (gesamt)         | 14,19 mg / Dosis              | 18,77 mg / Dosis |

+) Silymarin Kapseln, Durachemie, Tegernsee

++) Legalon <sup>o</sup> Dragees, Madaus, Köln

Interpretation der in Tabelle 9 wiedergegebenen Resultate:

- a) Am auffälligsten sind die Schwankungen im Gehalt an Silydianin bei den einzelnen Drogen. Geht man von dem ermittelten Höchstgehalt von etwa 0,5% bezogen auf Silybin aus, so ergibt sich nach Korrektur ein ungefährer Gehalt von 3% Silydianin. Hier stellt Silydianin die Hauptkomponente der Silymarine dar (Drogen Nr. 4, 14 und 15). Bei der Mehrzahl der Mariendistelextrakte war der Silydianingehalt dagegen sehr niedrig und konnte durch elektronische Integration nicht mehr exakt erfasst werden (vgl. Abb. 15 - Droge Nr. 1).
- b) Der Gehalt der übrigen Silymarine war keinen so extremen Schwankungen unterworfen.
- c) Bei den bestimmten 17 Drogenmustern liegt der Silymarinesamtgehalt nach dieser Methode zwischen 2,5 und 4,0% (bezogen auf Silybin). Nach dem heutigen Stand der pharmakologischen Untersuchungen<sup>104)</sup> entspricht der ermittelte Gesamtgehalt dem ungefähren Wirkwert der Drogen. Man muß deshalb mit erheblichen qualitativen Unterschieden bei Drogen verschiedener Provenienz rechnen.
- d) Die Silymarinbestimmung in Arzneispezialitäten führt zu Werten, die bei etwa der Hälfte des deklarierten Gehaltes liegen. Ein Vergleich mit den von den Herstellern durchgeführten Gesamtbestimmungsverfahren ist nur bedingt möglich, weil der als Silybinomer bezeichnete Anteil - über dessen pharmakologische Wirkung bisher keine Aussagen gemacht wurden - mit der fluorometrischen Methode nicht erfasst wird.
- e) Die Relationen der Silymarine stimmen in Arzneispezialitäten und Mariendistelextrakten weitgehend überein. Es ist aber an dieser Stelle darauf hinzuweisen, daß in der als (I) bezeichneten Spezialität offensichtlich ein Abbau des Silybins zu Dehydrosilybin stattgefunden hat. Bei allen anderen Analysen lag dagegen der Gehalt an Dehydrosilybin unter der Erfassungsgrenze. Da aber DHSB eine deutlich geringere antihepatotoxische Wirkung besitzt<sup>104)</sup>

und ein Abbau von Silybin zu Dehydrosilybin durch die bisherigen Gesamtbestimmungsverfahren nicht nachweisbar ist, kann nur die Wertbestimmung der Silymarine durch fluorometrische Direktauswertung über Veränderungen bei der Herstellung und Lagerung von Arzneispezialitäten Aufschluß geben.

- f) Aus den Untersuchungen der verschiedenen Drogenextrakte ergaben sich keine Anhaltspunkte der Art, daß bei Überwiegen einer Komponente eine andere entsprechend verringert ist. Wir haben deshalb die Korrelation zwischen mehreren Komponenten ermittelt und überprüft, ob ein hoher methanollöslicher Anteil auf einen hohen Gehalt an Silymarinen hinweist (s.Tab.10).

| Nr.: | Silymarine/<br>MeOH-Anteil | Silybin/<br>Silydianin | Silybin/<br>Silychristin | Silydianin/<br>Silychristin | Silybin/Sily-<br>dian.+Silychr. |
|------|----------------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| 1    | 3,04/11,89                 | 1,84/0,00              | 1,84/0,86                | 0,00/0,86                   | 1,84/0,86                       |
| 2    | 3,96/13,64                 | 1,82/0,26              | 1,82/1,25                | 0,26/1,25                   | 1,82/1,51                       |
| 3    | 2,68/12,38                 | 1,08/0,39              | 1,08/0,42                | 0,39/0,42                   | 1,08/0,81                       |
| 4    | 2,78/ 9,46                 | 1,14/0,43              | 1,14/0,50                | 0,43/0,50                   | 1,14/0,93                       |
| 5    | 2,85/12,62                 | 1,57/0,00              | 1,57/0,92                | 0,00/0,92                   | 1,57/0,92                       |
| 6    | 3,56/12,51                 | 1,81/0,25              | 1,81/0,94                | 0,25/0,94                   | 1,81/1,19                       |
| 7    | 2,66/11,24                 | 1,28/0,00              | 1,28/0,69                | 0,00/0,69                   | 1,28/0,69                       |
| 8    | 2,61/10,81                 | 1,38/0,00              | 1,38/0,67                | 0,00/0,67                   | 1,38/0,67                       |
| 9    | 2,65/12,38                 | 1,30/0,30              | 1,30/0,51                | 0,30/0,51                   | 1,30/0,81                       |
| 10   | 2,74/11,21                 | 1,24/0,26              | 1,24/0,65                | 0,26/0,65                   | 1,24/0,91                       |
| 11   | 2,55/10,69                 | 1,39/0,00              | 1,39/0,76                | 0,00/0,76                   | 1,39/0,76                       |
| 12   | 3,11/11,18                 | 1,38/0,29              | 1,38/0,79                | 0,29/0,79                   | 1,38/1,08                       |
| 13   | 2,84/11,03                 | 1,49/0,00              | 1,49/0,94                | 0,00/0,94                   | 1,49/0,94                       |
| 14   | 3,53/10,93                 | 1,45/0,47              | 1,45/0,71                | 0,47/0,71                   | 1,45/1,18                       |
| 15   | 3,03/ 9,90                 | 1,21/0,42              | 1,21/0,61                | 0,42/0,61                   | 1,21/1,03                       |
| 16   | 2,76/10,38                 | 1,25/0,35              | 1,25/0,69                | 0,35/0,69                   | 1,25/1,04                       |
| 17   | 3,45/11,23                 | 1,50/0,36              | 1,50/0,84                | 0,36/0,84                   | 1,50/1,20                       |
| r =  | 0,42207                    | - 0,37222              | 0,86233                  | - 0,36514                   | 0,49421                         |
| T =  | 1,80314                    | - 1,55321              | 6,59592                  | - 1,51906                   | 2,20173                         |

Tabelle 10

Korrelationen zwischen Silymarinen

Die in der Tabelle angegebenen Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) können nur so interpretiert werden, daß zwischen den in den Gruppen zusammengefassten Komponenten keine lineare Abhängigkeit besteht. In der Gruppe Silybin/Silychristin deutet der Korrelationskoeffizient darauf hin, daß ein hoher Gehalt an Silybin meist mit einem hohen Gehalt an Silychristin verbunden ist. Für weitergehende Aussagen über Biosynthese der Silymarine und chemische Rassen müssten diese Zusammenhänge über mehrere Vegetationsperioden und an einer größeren Anzahl von Untersuchungsproben verfolgt werden.

#### 5.4. WEITERE BEITRÄGE ZUR ANALYTIK DER SILYMARINE

Der chromatographische Nachweis mehrerer neuer Verbindungen in Mariendistel-extrakten, die im beschriebenen System von anderen Komponenten nicht vollständig abgetrennt werden, gab Veranlassung, mit einer zweidimensionalen Chromatographie die Trennung dieser Verbindungen zu versuchen. Während dies für die zwischen Silydianin und Silychristin beobachtete Zone mit der Bezeichnung "Flavon X" gut gelang, konnte eine noch bessere Abtrennung des Isosilybins von Silybin nicht erreicht werden. Daraus ist zu folgern, daß eine große strukturelle Ähnlichkeit bei den beiden Substanzen besteht. Aus diesen Untersuchungen geht weiter hervor, daß die Zone "Flavon X", die im Pflanzenextrakt in relativ hoher Konzentration nachzuweisen ist, aus zwei Substanzen besteht. Die Abb. 16 zeigt die zweidimensionale Kieselgel-Dünnschichtchromatographie der Silymarine.

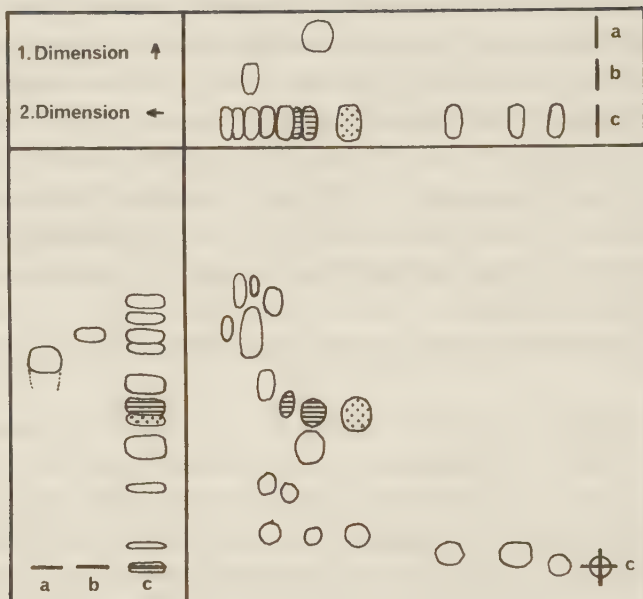


Abb. 16

2 D - DC der Silymarine auf Kieselgel

Erläuterungen zur Abb. 16

punktiert: Taxifolin  
 schraffiert: Flavon X  
 a : Quercetin  
 b : Silybin  
 c : Mariendistelextakt

Zusätzlich haben wir überprüft, ob im System Chloroform:Aceton:Ameisensäure - 9:2:1 auch eine Auftrennung der Silymarine von Hydnocarpusfrüchten gelingt. Wie die Abb. 17 wiedergibt, können Hydnocarpin, sein Grundkörper Luteolin und weitere unbekannte Verbindungen ebenfalls gut getrennt werden.



- a = Mariendistelextakt  
 b = Hydnocarpusextrakt  
 c = Hydnocarpin  
 d = Luteolin

Abb. 17

Chromatographischer Vergleich von  
Hydnocarpus- und Mariendistelextakt

Alle bisher durchgeführten Versuche auf Kieselgel zeigten, daß auf diesem Sorbens die besten Trennergebnisse erzielt werden. Es konnte jedoch auf dieser stationären Phase durch keine Fließmittelvariation eine grundsätzlich andere Fleckenfolge erreicht werden. Da es zur Feststellung der chromatographischen Reinheit isolierter Substanzen immer vorteilhaft ist, wenn man zwei unterschiedliche chromatographische Methoden zur Verfügung hat, haben wir auch die Polyamidchromatographie

getestet. In Analogie zu den in Kapitel 5.1.4.2. angestellten Überlegungen konnten wir durch Zusatz von Ameisensäure zur mobilen Phase und Verwendung von Mikropolyamid ebenfalls eine gute Trennung erreichen. Es muß aber festgestellt werden, daß die Separation auf Kieselgel bessere Ergebnisse liefert. Die Folien im Format 15 x 15 cm lassen sich nicht im Scanner befestigen. Außerdem werden sie beim Auftragen und Detektieren wegen der geringen Belastbarkeit des Schichtmaterials mit Lösungsmittel durchnässt und sind auch deshalb für eine DC-Direktauswertung unbrauchbar.

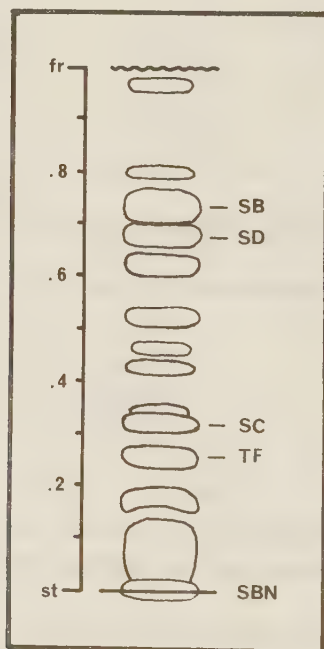


Abb. 18

DC der Silymarine auf Mikropolyamid

## 6. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON RUTIN IN EINER DROGE UND EINER ARZNEISPEZIALITÄT

Unter den flavonoiden Verbindungen kommt dem Rutin wegen seiner vielseitigen pharmakologischen Wirkung und seines breiten therapeutischen Einsatzes auch heute noch eine große Bedeutung zu. Da Rutin zudem sehr häufig die Hauptkomponente unter den Flavonoiden eines Drogenextraktes darstellt, worauf standardisiert werden kann, war eine fluorometrische Bestimmung von besonderem Interesse.

Die in den Pharmakopöen angegebenen Bestimmungen beruhen durchwegs auf der hydrolytischen Spaltung des Glykosids und der anschließenden gravimetrischen oder spektrophotometrischen Erfassung des Aglykons Quercetin. Für die quantitative Analyse der Reinsubstanz und von Zubereitungen, die Rutin als einzigen Wirkstoff enthalten, ist dieses Verfahren ausreichend. Für die Untersuchung von zusammengesetzten Arzneispezialitäten sowie zur Wertbestimmung des Rutins in Drogen muß eine spezifischere Methode ausgearbeitet werden. Die optimale Lösung dieses Problems stellt auch in diesem Fall die chromatographische Abtrennung des Rutins mit anschließender fluorometrischer Direktauswertung dar.

### 6.1. VORAUSSETZUNG FÜR DIE WERTBESTIMMUNG DES RUTINS DURCH DC-DIREKTAUSWERTUNG

Für die fluorometrische Rutinbestimmung können die im Zusammenhang mit der Wertbestimmung der Silymarine gemachten Erfahrungen übernommen werden. In Analogie dazu kann auch Rutin nach der kombinierten Detektion mit DBAÄE und PEG im Nannogrammbereich bestimmt werden. Es ist aber in jedem Fall erforderlich, die Proportionalität zwischen Konzentration und registrierter Peakfläche zu überprüfen. Wie die Abb. 18 zeigt, erhält man bei einer Rutin-Konzentrationsreihe gut auswertbare Peaks.



Abb. 18

Ortskurve einer Rutinkonzentrationsreihe

(100 - 900 ng)

Für die oben abgebildete Konzentrationsreihe bestimmten wir den Korrelationskoeffizienten mit  $r = 0,992$ , womit die für eine quantitative Bestimmung erforderliche Proportionalität zwischen Konzentration und Fluoreszenzintensität gewährleistet ist (Die Meßwerte für diese Konzentrationsreihe werden im Anhang 2 wiedergegeben).

## 6.2. WERTBESTIMMUNG VON HERBA RUTAE

Das chromatographische Bild des mit Methanol unter Erwärmen hergestellten Extraktes aus Herba Rutae zeigt neben dem deutlichen Rutinfleck keine weiteren orange gefärbten Zonen mehr. Die im Drogenextrakt enthaltenen Cumarine und eine grün fluoreszierende Zone stören bei der quantitativen Bestimmung des Rutins nicht (siehe Abb. 19; R = Rutin).

Von einem Drogenmuster wurden unter gleichen Bedingungen drei Extrakte hergestellt, chromatographiert, detektiert und fluorometrisch direkt ausgewertet. (Die Meßergebnisse dieser Bestimmung werden im Anhang 2 wiedergegeben, die allgemeine Berechnungsgrundlage für die Wertbestimmung von Herba Rutae im Anhang 3) Als Rutingehalt bezogen auf die getrocknete Ausgangsdroge ermittelten wir 2,14%. Dieser Wert liegt weit über dem von Luckner<sup>115)</sup> geforderten Mindestgehalt von 0,8% flavonoider Verbindungen, berechnet als Rutin.

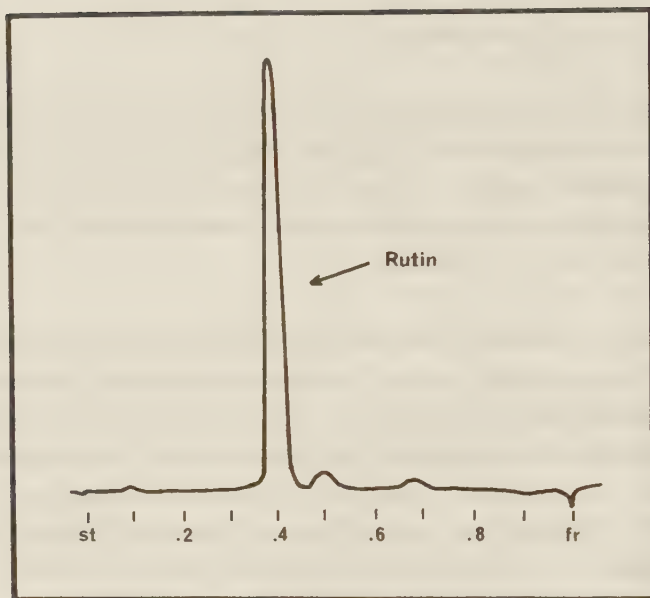


Abb. 19

Fluoreszenzortskurve eines Extraktes aus *Herba Rutae*

Zur Untersuchung wurde ein Kombinationspräparat verwendet, das außer Rutin noch Nitroglycerin, Pentaerythroltetranitrat, Mannitolhexanitrat und organische Magnesiumsalze enthielt. Die Tabletten wurden mit Methanol extrahiert. Die Untersuchungslösung wurde chromatographiert, detektiert und fluorometrisch direkt ausgewertet. Als Mittelwert aus drei Bestimmungen fanden wir 10,325 mg pro Dosis. Der deklarierte Gehalt von 10 mg Rutin war um 3,25% überschritten. Die Abweichung vom Sollwert liegt innerhalb der Größenordnung des Variabilitätskoeffizienten der fluorometrischen Bestimmung.

Die beschriebene Wertbestimmung von Rutin in Droge und Arzneispezialität ist in analoger Weise zur Bestimmung anderer flavonoider Verbindungen geeignet.

Wie bereits ausgeführt, erschwert die Vielzahl der verschiedenen in Flavondrogen vorkommenden Flavonverbindungen die Identitäts-, Reinheitsprüfung und Wertbestimmung sehr. Außerdem ist bis heute nicht gesichert, ob alle, bzw. welche Flavontypen an der pharmakologischen Wirkung beteiligt sind. Daraus ergibt sich für die Analytik dieser Drogen die Aufgabe, die Gesamtheit der Verbindungen nach einem einheitlichen chromatographischen Verfahren aufzutrennen, sie durch spezifische Detektion sichtbar zu machen und das erhaltene Chromatogrammbild zu dokumentieren. Im Gegensatz zur skizzenhaften oder photographischen Chromatogramm-Wiedergabe, die von den Registrierstellen nicht als authentische Methoden anerkannt werden, stellt die fluorometrische Aufzeichnung einen neuen Weg zur Dokumentation dar. Fluorogramme erfüllen durch drogenspezifischen "finger-print" die Voraussetzungen zur Unterscheidung und Identifizierung von Drogen und daraus hergestellten Zubereitungen.

Die erforderlichen Voraussetzungen zur Fluorographie der Flavondrogen bestehen in der:

- a) Herstellung der Pflanzenauszüge nach einer einheitlichen Vorschrift
- b) Auswahl eines allgemein gültigen chromatographischen Trennsystems, das zur Unterscheidung aller Flavondrogen geeignet ist
- c) Normierung der Entwicklungs- und Detektionstechnik
- d) Anpassung der fluorographischen Meß-Wellenlängen an die unterschiedlichen Emissionen der aufgetrennten Verbindungen.

zu a) Auf Grund der hohen Empfindlichkeit der fluorometrischen Direktauswertung müssen bei der Herstellung der Untersuchungslösungen aus den Drogen keine komplizierten Anreicherungs- oder Reinigungs-

verfahren durchgeführt werden. Durch Extraktion von 1 Gew.T. fein gepulverter (Sieb Nr. 180, ISO Nov. 1964), getrockneter Droge mit 10 Vol. Teilen Methanol zur Analyse erhält man unter Erwärmen auf 60°C über 10 Minuten und kräftigem Schütteln die erforderliche Prüflösung. Von der filtrierten Lösung werden 10 µl strichförmig aufgetragen.

- zu b) Die Vielzahl phenolischer Pflanzeninhaltsstoffe aus den verschiedenen Gruppen kann in einem einzigen System nicht vollständig getrennt werden. Da die Untersuchung der Flavonaglykone, die als Grundkörper wenig pflanzenspezifisch sind, zur Identifizierung nicht ausreicht, haben wir zur Unterscheidung die glykosidischen Verbindungen herangezogen. Diese kommen genuin in allen Flavondrogen vor.

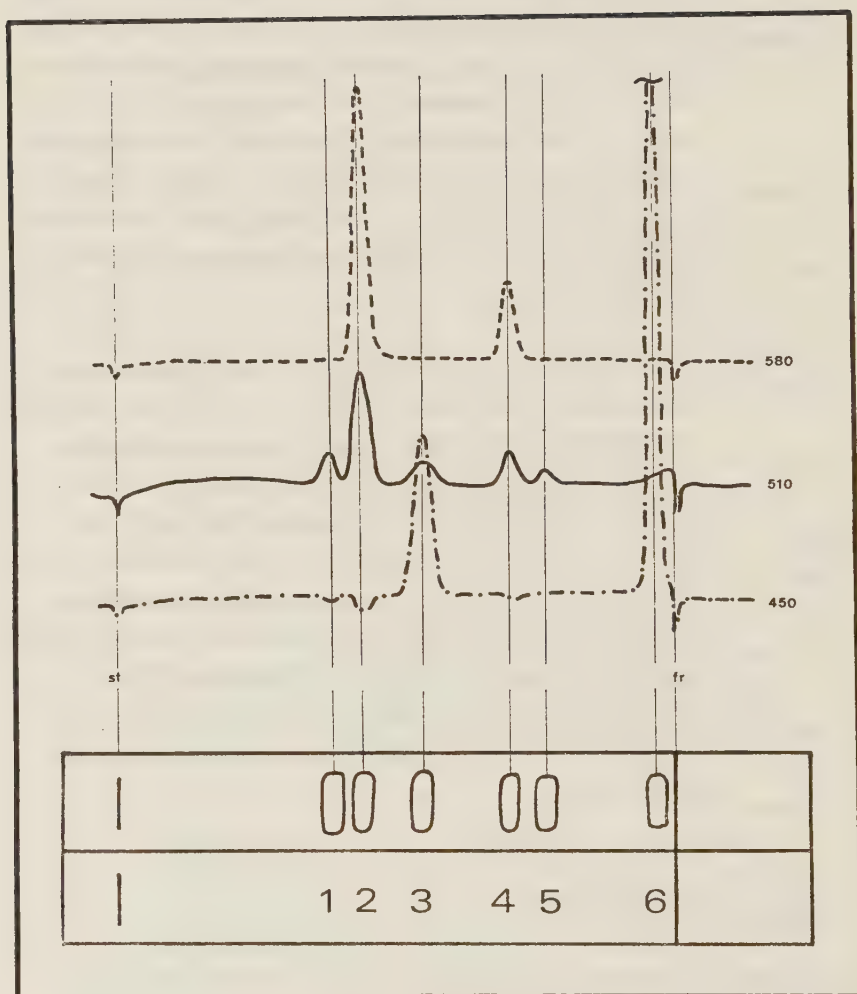
Zur chromatographischen Trennung dieser Gruppe wurde von Steigeger<sup>105)</sup> ein Fließmittelsystem für Kieselgel als Sorbens beschrieben, das den Anforderungen für eine nachfolgende Direktauswertung entspricht. In diesem System werden jedoch nicht nur Flavonglykoside aufgetrennt, sondern auch eine Reihe von Pflanzensäuren und Cumarinderivaten. Die charakteristischen Unterschiede, die auch diese Verbindungen bei den verschiedenen Flavondrogen zeigen, haben uns dazu veranlasst, diese Stoffe mit in die fluorographische Auswertung einzubeziehen.

Die zur Anfertigung von Fluorogrammen erforderlichen Chromatogramme werden auf Kieselgel-Dünnschichtplatten im Fließmittelsystem ÄTHYLACETAT : AMEISENSÄURE : WASSER = 10:2:3 (V/V/V) hergestellt. Für die mobile Phase finden nur analysenreine Lösungsmittel Verwendung.

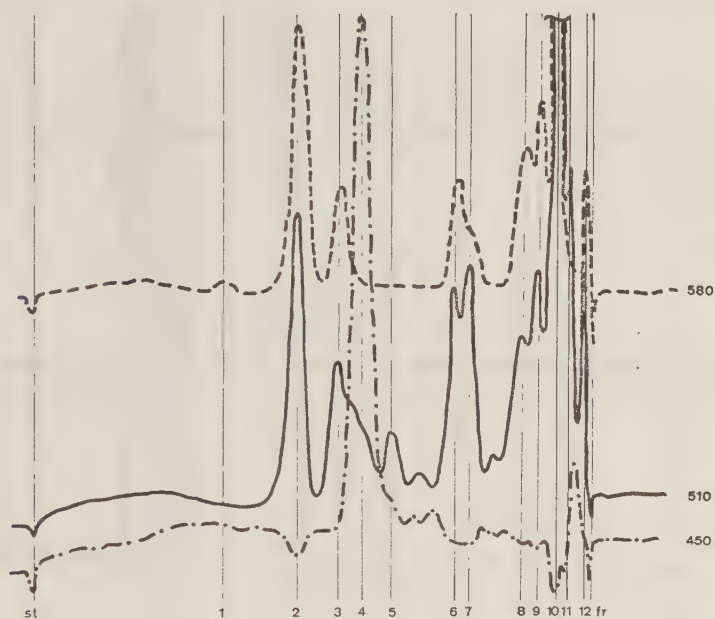
- zu c) Um Chromatogramme miteinander vergleichen zu können, müssen die durch die Entwicklung und Detektion bedingten Unterschiede so gering wie möglich gehalten werden. Die Parameter, die die Trennung beeinflussen, sind in den Standardwerken der Dünnschichtchromatographie<sup>81, 103)</sup> eingehend beschrieben worden. Für die Fluorographie als Routinemethode ist es erforderlich, einen Kompromiß zwischen den theoretisch möglichen und den praktisch vertretbaren Normierungen zu schließen. Im Experimentellen Teil wird das vorgeschlagene Schema für die Auftragung, Entwicklung und Detektion wiedergegeben.
- zu d) Die zur Identifizierung von Flavondrogen herangezogenen Verbindungen emittieren nach ihrer Detektion im UV-Licht (366 nm) unterschiedliche Sekundärstrahlungen. Derivate des Quercetins zeigen meist orange, die des Kämpferols grüne Fluoreszenz, während Cumarine blau und Pflanzensäuren türkis gefärbt sind. Da mit der Aufnahme einer Fluoreszenzortskurve bei einer Wellenlänge nur die Verbindungen erfasst werden, die in diesem Wellenlängenbereich fluoreszieren, kann nur durch eine Registrierung bei drei verschiedenen Wellenlängen der gesamte Informationsgehalt erfasst und dokumentiert werden. Die gewählten Wellenlängen (450, 510 und 580 nm) entsprechen Sekundäremissionen mit blauer, grüner und oranger Färbung.

## 7.2. FLUOROGRAMME

Im folgenden Teil werden die Fluorogramme des Testgemisches und mehrerer Drogenextrakte wiedergegeben und diskutiert.

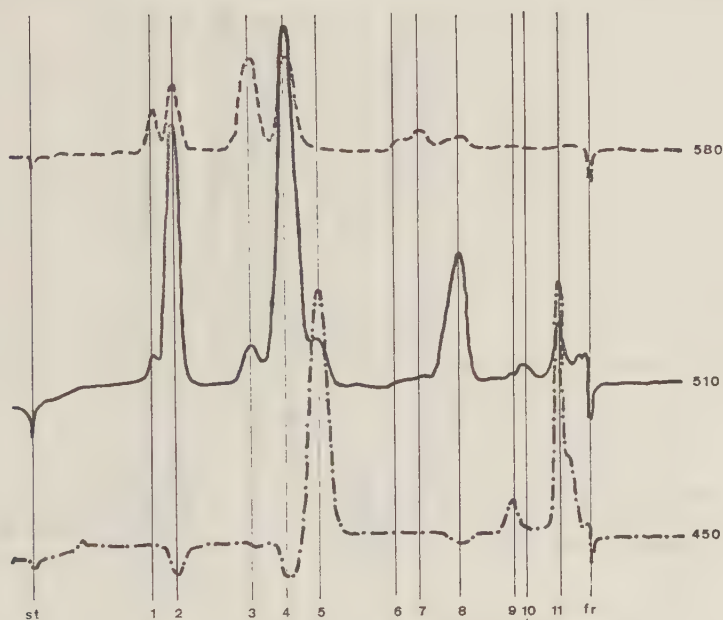


Testgemisch



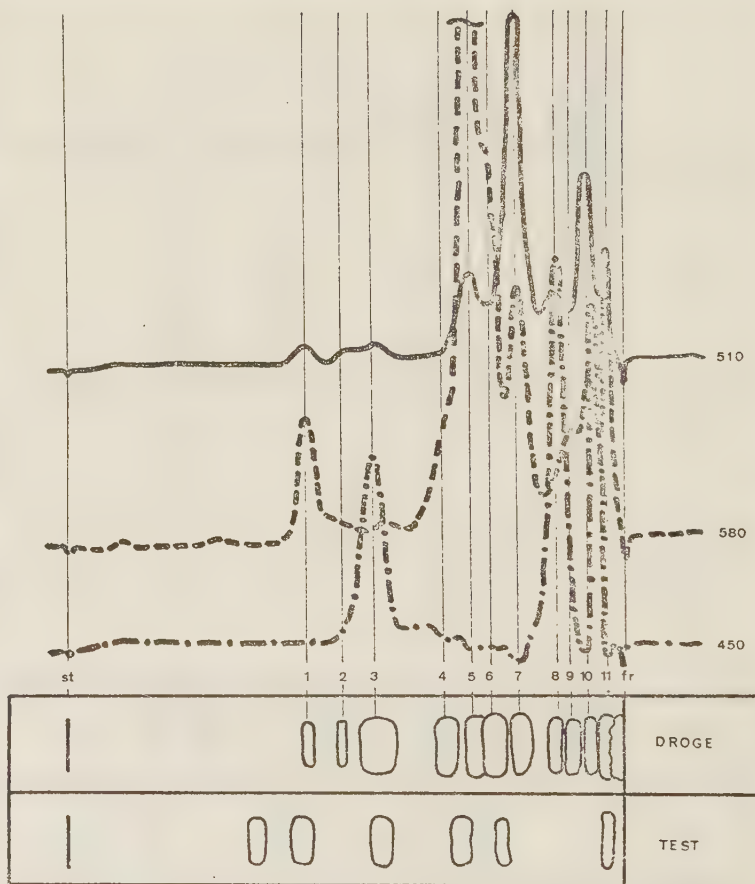
Flores Acaciae



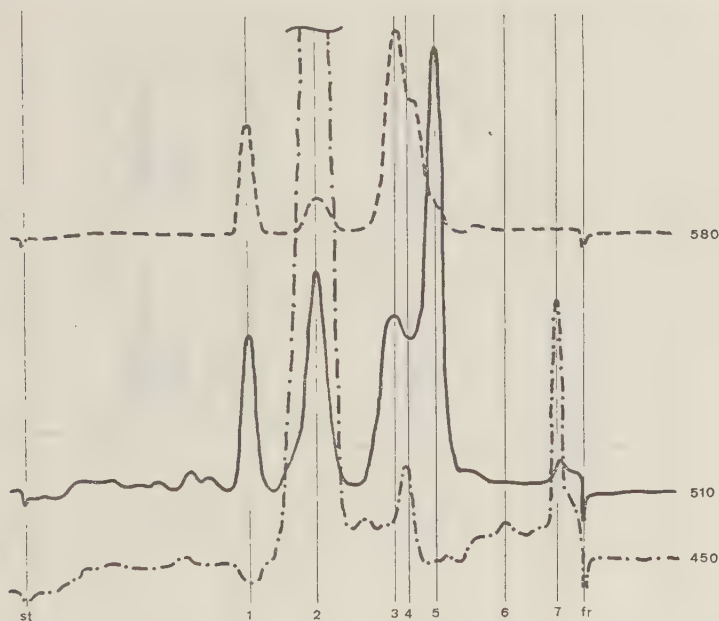


|  |    |     |     |     |     |       |
|--|----|-----|-----|-----|-----|-------|
|  | 00 | 000 | 000 | 000 | 000 | DROGE |
|  | 00 | 0   | 00  | 0   | 0   | TEST  |

Flores Calendulae

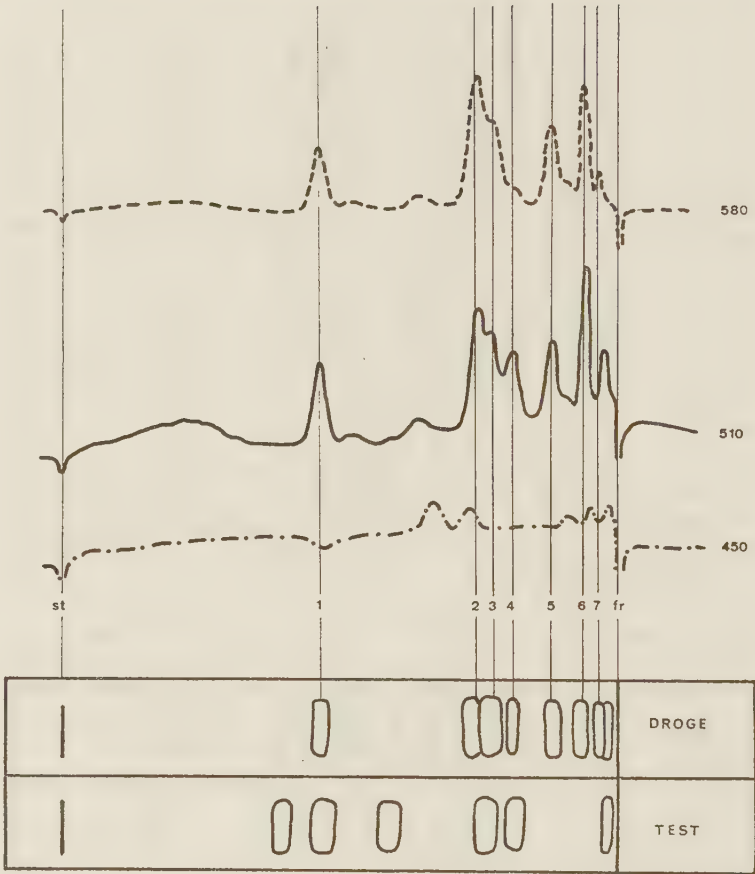


Flores Chamomillae



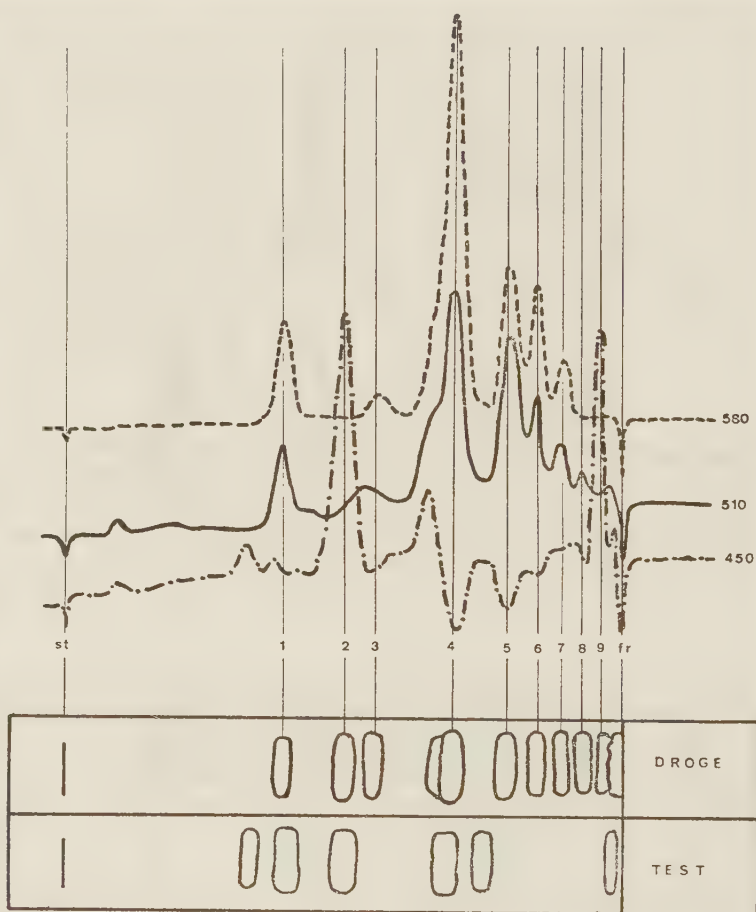
|  |  |    |   |      |   |   |       |
|--|--|----|---|------|---|---|-------|
|  |  | 0  | 0 | 0000 | 0 | 0 | DROGE |
|  |  | 00 | 0 | 00   |   | 0 | TEST  |

Flores Crataegi

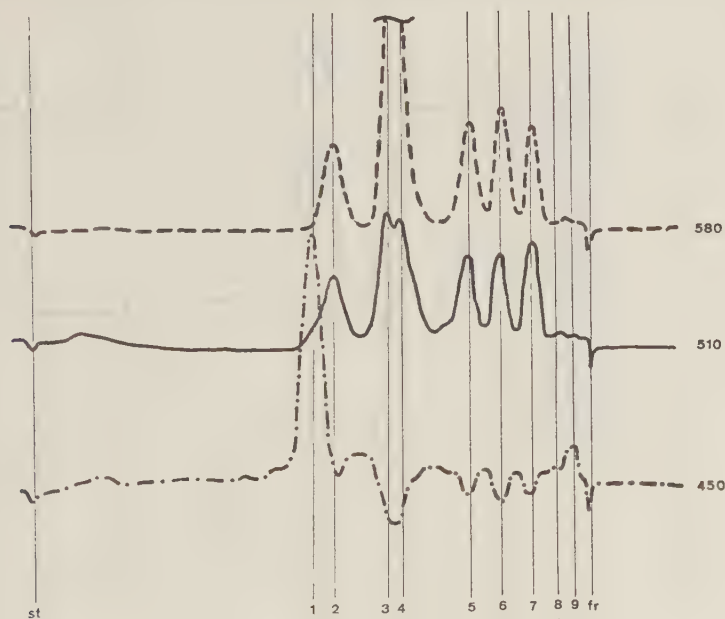


Flores Spireae



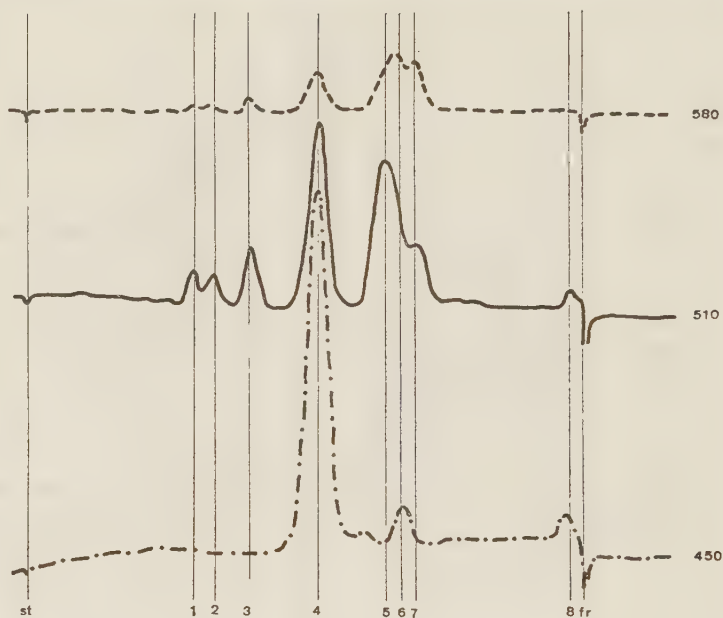


Flores Tiliae off.



|  |  |  |  |  |  |  |  |       |
|--|--|--|--|--|--|--|--|-------|
|  |  |  |  |  |  |  |  | DROGE |
|  |  |  |  |  |  |  |  | TEST  |

Folia Betulae



|   |     |     |    |    |    |   |       |
|---|-----|-----|----|----|----|---|-------|
| I | III | IV  | V  | VI | 7  | 8 | DROGE |
| I | II  | III | IV | V  | VI | 7 | TEST  |

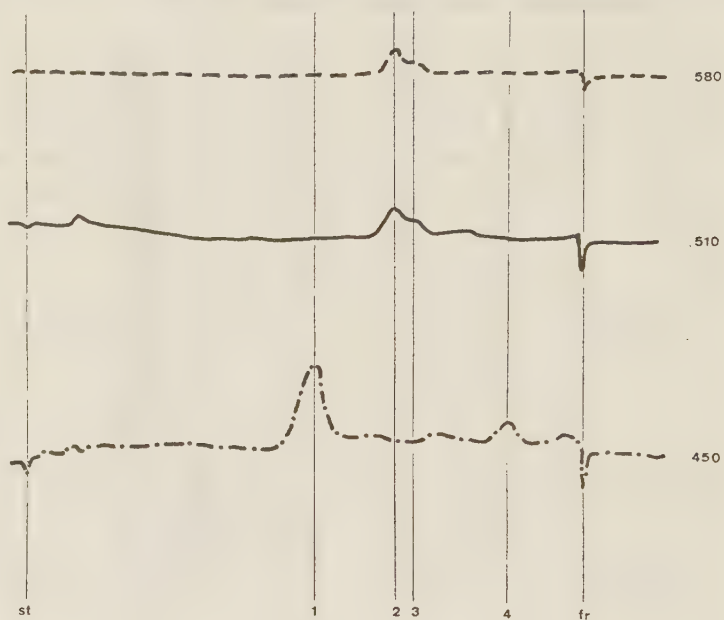
**Folia Crataegi**

( Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser = 20:2:3 )



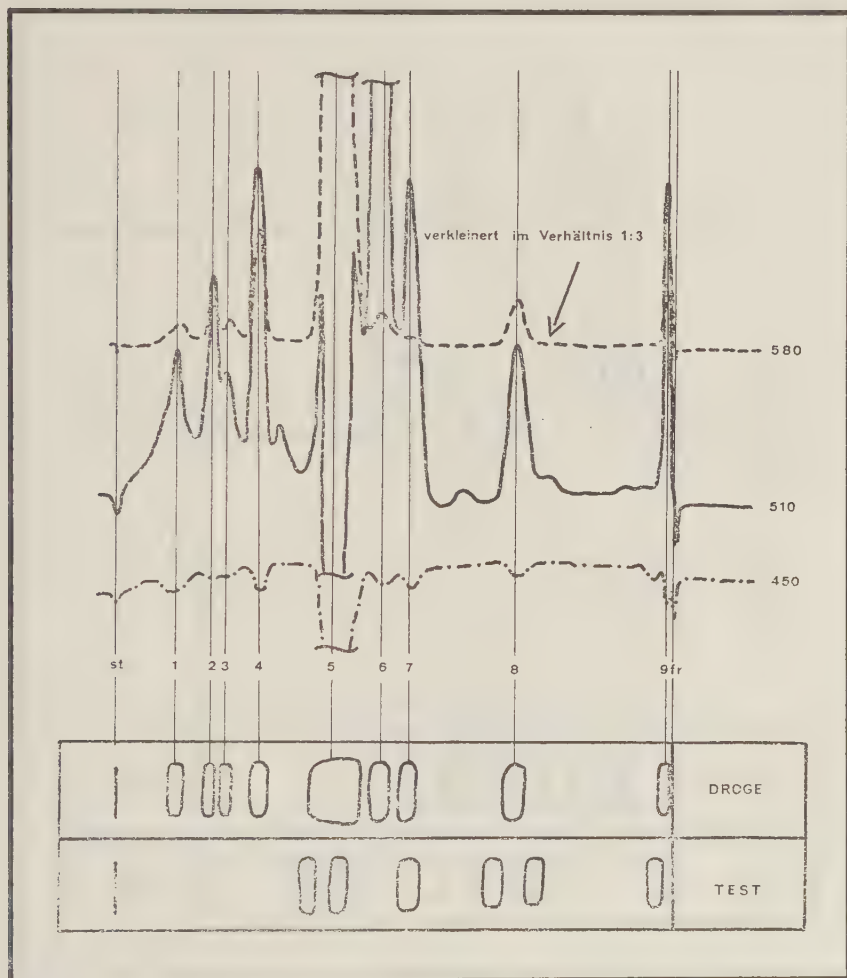
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-------|
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | DROGE |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | TEST  |

Folia Melissae



|   |    |    |    |   |       |
|---|----|----|----|---|-------|
| 1 | 0  | 00 | 0  |   | DROGE |
| 1 | 00 | 0  | 00 | 0 | TEST  |

## Fructus Crataegi

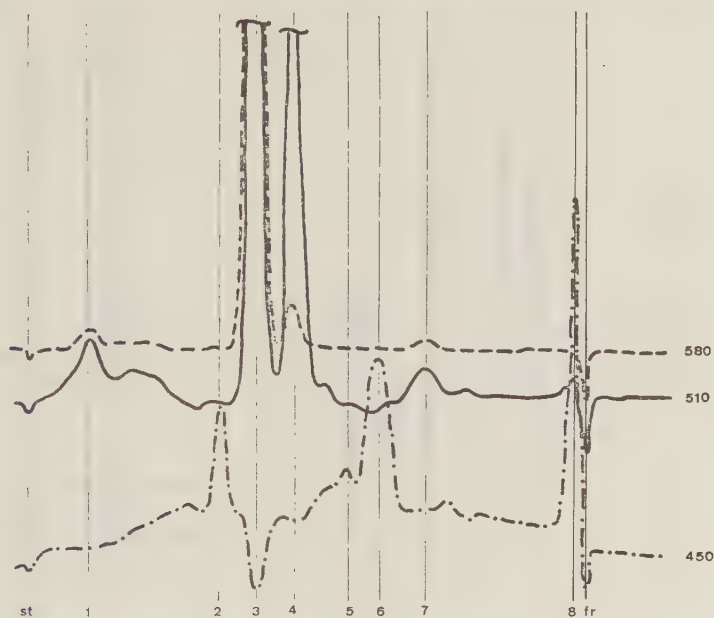


Gemmae Sophorae



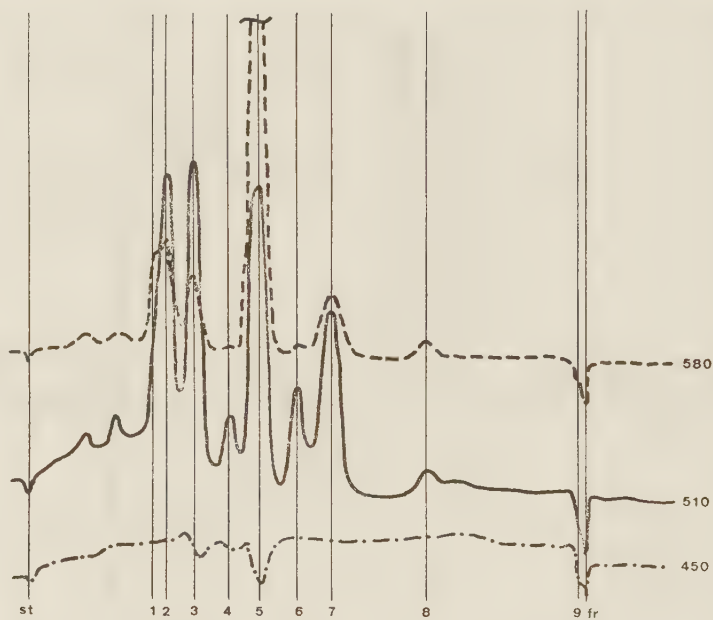
|   |         |       |
|---|---------|-------|
| I | 0000000 | DROGE |
| I | 0000000 | TEST  |

Herba Centaurii



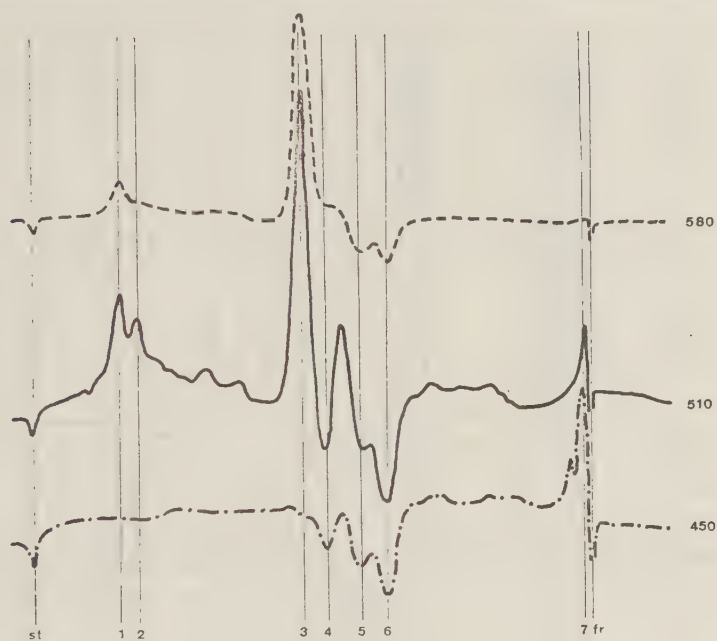
|   |   |   |   |   |   |   |   |       |
|---|---|---|---|---|---|---|---|-------|
| I | O | O | O | O | O | O | O | DROGE |
| I |   | O | O | O | O | O | O | TEST  |

Herba Rutae



|  |  |   |   |   |   |   |   |   |   |       |
|--|--|---|---|---|---|---|---|---|---|-------|
|  |  | o | o | o | o | o | o |   | o | DROGE |
|  |  |   | o | o |   | o |   | o | o | TEST  |

Herba Violae



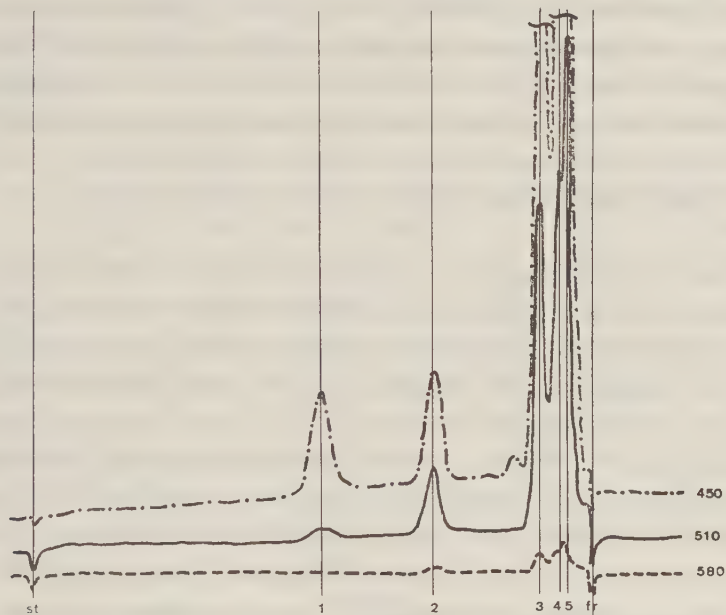
|  |  |  |  |  |  |  |       |
|--|--|--|--|--|--|--|-------|
|  |  |  |  |  |  |  | DROGE |
|  |  |  |  |  |  |  | TEST  |

Pericarpium Aurantii



|  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-------|
|  |  |  |  |  |  |  |  |  | DROGE |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  | TEST  |

Pericarpium Citri



|  |  |  |  |  |       |
|--|--|--|--|--|-------|
|  |  |  |  |  | DROGE |
|  |  |  |  |  | TEST  |

Radix Arnicae

### Diskussion der Fluorogramme:

Die Identitäts- bzw. Reinheitsprüfung von Flavondrogen erfolgt in der Weise, daß das Fluorogramm der zu prüfenden Droge mit dem der authentischen Droge verglichen wird. Entscheidend ist dabei die Übereinstimmung der beiden Fluorogramme in allen wesentlichen Peaks und im gesamten Kurvenverlauf; geringfügige Peakerrhöhungen oder -erniedrigungen sind dabei unerheblich. In den meisten Fällen sind die Unterschiede zu den Kurvenbildern anderer Flavondrogen so eindeutig, daß weitere Identifizierungsmethoden nicht mehr erforderlich sind.

Bei der Standardisierung von Arzneipflanzen durch die Fluorographie ist zu berücksichtigen, daß die Zusammensetzung der phenolischen Pflanzeninhaltsstoffe in Drogen natürlichen biologischen Schwankungen (bedingt durch Vegetationsperiodizität, Erntezeitpunkt etc.) unterliegt. Außerdem haben Arbeiten der letzten Jahre gezeigt, daß Verbindungen dieser Klasse nicht als metabolisch inaktiv angesehen werden können<sup>106</sup>). Phenolische Pflanzeninhaltsstoffe unterliegen Abbau- und Umwandlungsprozessen. Andererseits haben unsere Untersuchungen deutlich gezeigt, daß die für die Reinheits- und Identitätsprüfung erforderlichen drogenspezifischen Merkmale erhalten bleiben. Diese Ergebnisse finden eine Bestätigung in den Untersuchungen von Murray und Williams<sup>107, 108</sup>) an verschiedenen Brizzasorten. Nach Ansicht dieser Autoren ist die Bildung der Flavone sehr stark genetisch fixiert und vom Standort weitgehend unabhängig.

Die wiedergegebenen Fluorogramme wurden von authentischen Drogen aufgenommen. Im Folgenden werden einige Besonderheiten bei der Auswertung der Fluorogramme erläutert.

#### a) Fluorogramm des Testgemisches

Das Testgemisch wurde so gewählt, daß einmal der gesamte Rf-Bereich dadurch normiert werden kann und zum anderen die resultierenden Fluoreszenzen in den drei gewählten Wellenlängenbereichen liegen. Als Referenzsubstanzen dienen Kämpferol-3-sophorosid (1), Rutin (2), Chlorogensäure(3),

Hyperosid (4), Vitexin (5) und Scopoletin (6). In allen Drogenfluorogrammen werden unter der skizzenhaften Darstellung der Zonen des Drogenchromatogramms die Zonen dieses Testgemisches wiedergegeben.

Die strichpunktierte Fluorogrammkurve gibt den blau fluoreszierenden Anteil wieder (Exc. 366 nm/Em. 450 nm). Die ausgezogene Kurve stellt grüne Emissionen (Exc. 450/Em. 510 nm) dar, während die gestrichelte Fluorogrammkurve rötliche Emissionen (Exc. 450/Em. 580 nm) symbolisiert.

Das Fluorogramm des Testgemisches zeigt im Verlauf der gestrichelten Ortskurve deutlich den Rutinpeak (2) und den Peak von Hyperosid (4). Betrachtet man die durchgezogene Linie, so erkennt man nicht nur die grünlich fluoreszierenden Verbindungen Kämpferol-3-sophorosid (1) und Vitexin (5), sondern auch Peaks für Rutin, Hyperosid und Chlorogensäure.

Daraus ist zu schließen, daß deren Emissionsspektrum sich bis in den Wellenbereich von 510 nm erstreckt. Aus den Relationen von Peaks einer Substanzzone bei den verschiedenen Wellenlängen kann man beispielsweise eine orange Fluoreszenz von einer roten unterscheiden, weil eine rote Fluoreszenz nur einen Peak bei 580 nm ergibt, eine orange dagegen einen intensiven Peak bei 580 nm und einen schwächeren bei 510 nm.

Einen weiteren Effekt, der bei der Interpretation berücksichtigt werden muß, zeigt die Emissionskurve, die bei der Emissionswellenlänge von 450 nm aufgenommen wurde. Deutlich sind Chlorogensäure (3) und Scopoletin (6) zu erkennen. Darüber hinaus treten weitere Peaks auf, die einen negativen Verlauf zu der gedachten Null-Linie zeigen. Die Basislinie, die den Fluorogrammkurven zugrunde gelegt wird, entspricht nicht dem Photometer-Nullpunkt, sondern dem Anteil konstanter Remission des unbeladenen Sorbens. Wenn eine DC-Platte mit Strahlung von 366 nm abgetastet wird, entsteht eine Streustrahlung an der Sorbensoberfläche mit einer spektralen Verteilung, die auch in den Wellenlängenbereich um 450 nm hineinreicht. Erfasst der Meßstrahl (Exc. 366 nm) eine Substanzzone, die durch Strahlung von 450 nm zu einer Fluoreszenz angeregt werden kann, so wird Streustrahlung absorbiert. Im Kurvenverlauf des Fluorogramms tritt ein negativer Peak auf, der

mit einem positiven Peak in einer oder in beiden anderen Fluoreszenzortskurven korrespondiert.

b) Fluorogramm von Flores Acaciae (*Prunus spinosa* L.)

Inhaltsstoffe (Nach Literaturangaben; eine Zuordnung war nicht in jedem Fall möglich): Kämpferol, Quercetin, Quercitrin, Rutin, Hyperosid, Acacetin-7-rutinosid.

Das Fluorogramm ist durch einen orange fluoreszierenden DC-Fleck (2 = Rutin), einen weiteren orange fluoreszierenden Fleck (3) zwischen Rutin und der Chlorogensäure (4) gekennzeichnet. Im Bereich zwischen Chlorogensäure und Hyperosid (6) findet man noch eine kräftige grüne Zone (5) und im Frontbereich mehrere orange Substanzflecke.

c) Fluorogramm von Flores Arnicae (*Arnica montana* L.)

Inhaltsstoffe: Luteolin, Luteolin-7-glucosid, Isoquercitrin (= Quercetin-3-glucosid), Astragalin (= Kämpferol-3-glucosid), Quercetin-3-glucogalacturonid.

Man erhält bei Arnikablüten zwischen Chlorogensäure und der Front mehrere orange und grün gefärbte Zonen (2 - 9).

d) Fluorogramm von Flores Calendulae (*Calendula officinalis* L.)

Inhaltsstoffe: Isorhamnetin-3-glucosid, -3-rutinosid, -3-rutinorhamnosid und andere Glykoside des Isorhamnetins.

Calendulablüten zeigen unter der Zone der Chlorogensäure zwei grün (2, 4) und zwei orange (1, 3) fluoreszierende Zonen.

e) Fluorogramm von Flores Chamomillae (*Matricaria chamomilla* L.)

Inhaltsstoffe: Luteolin-7-glucosid, Patulitrin, Quercimericitrin, Apigenin-7-glucosid, Apigenin-7- $\beta$ -apiosylglucosid, Apigenin, Rutin, Hyperosid und Herniarin.

Kamillenblüten enthalten Chlorogensäure (3) und im Rf-Bereich zwischen Vitexin und Scopoletin weitere türkis fluoreszierende Flecke (8, 10). Charakteristisch für die Kamillenblüten sind zwei orange Zonen (4 = Hyperosid, 6), eine gelborange Zone (5), die vermutlich eine Luteolinverbindung ist, und die an diese Gruppe anschließende Zone (7) mit grüner Fluoreszenz, die alle im Rf-Bereich zwischen Hyperosid und Vitexin liegen.

f) Fluorogramm von Flores Crataegi (*Crataegus oxyacantha* L.)

Inhaltsstoffe: Chlorogensäure, Kaffeesäure, Ursolsäure, Crataegolsäure und weitere Säuren. Quercetin-3-galaktosid (Hyperosid), Quercetinrhamnogalaktosid, Vitexin und sein Rhamnosid, ein Vitexindiglucosid, Vitexin-rhamnoglucosid, Rutin.

Das Fluorogramm zeigt einen deutlichen Rutinfleck (1). darüber die Chlorogensäure, Hyperosid (3); darüber findet man noch mehrere grün und orange fluoreszierende Chromatogrammzonen, die aber nicht typisch sind.

g) Fluorogramm von Flores Spireae (*Filipendula ulmaria* L.)

Inhaltsstoffe: Quercetin-4'-glucosid (Spiraeosid).

Hier findet man ebenfalls Rutin (1), zwei orange fluoreszierende Flecke (2, 3) und oberhalb von Hyperosid grün und türkis gefärbte Zonen (4, 5, 7).

h) Fluorogramm von Flores Tilia argent. (*Tilia argentea* D. synn. *Tilia tomentosa* M.)

Inhaltsstoffe: Kämpferol-7-p-cumaroyl-3- $\beta$ -glucosid (Tilirosid), Kämpferol-3-rhamnosid, -3-glucosid, -3-gluko-7-rhamnosid, Quercetin-3-rhamnosid, -3-gluko-7-rhamnosid, -3-glucosid.

Die als Verfälschung der offizinellen Lindenblüten verwendeten Blüten der Silberlinde zeigen einen deutlichen orangen Fleck (1) unterhalb des Rutins. Rutin ist nicht oder nur in sehr geringer Menge enthalten, ebenso Chlorogensäure (3). Hinzuweisen ist noch auf die grün fluoreszierenden Zonen (2, 6, 8, 9), die in der Arzneibuchware nicht vorkommen.

- i) Fluorogramm von Flores Tiliae off. (*Tilia platyphyllos* S. bzw. *Tilia cordata* M.)

Inhaltsstoffe: Kämpferol-3,7-rhamnosid, Tilirosid, Kämpferitrin, Astragalin, Quercetin-3-gluco-7-rhamnosid, Quercetrinrhamnoxylosid.

Die offizinelle Droge zeigt einen deutlichen Rutinfleck (1). Chlorogensäure ist in hoher Konzentration enthalten (2). Zwischen Vitexin und der Laufmitelfront findet man mehrere orange gefärbte Flecke (5, 6, 7).

- j) Fluorogramm von Folia Betulae (*Betula pubescens* E. und *Betula pendula* R.)  
Inhaltsstoffe: Myricetin-3-digalaktosid.

Birkenblätter enthalten kein Rutin, deutlich Chlorogensäure (1) und Hyperosid (3). Im oberen Rf-Bereich treten noch weitere orange gefärbte Verbindungen auf.

- k) Fluorogramm von Folia Crataegi (*Crataegus oxyacantha* L.)

Inhaltsstoffe: s. Flores Crataegi; als Hauptflavonoid wird Vitexin-4-rhamnosid genannt.

Weißdornblätter erkennt man an zwei charakteristischen grünen DC-Flecken (1, 2) unterhalb der Zone (3), in der Rutin und Vitexinrhamnosid liegen (eine Abtrennung erfolgt in diesem System nicht). Darüber findet man noch eine grüne Zone (5) und Hyperosid (6).

- l) Fluorogramm von Folia Melissa (*Melissa officinalis* L.)

Inhaltsstoffe: Bernstein-, Ursol-, Oleanol-, Kaffee- und Protocatechusäure, Apigenin, Luteolin, Rhamnazin, Luteolin-7-glucosid.

Man erkennt eine Vielzahl blau-türkis fluoreszierender Zonen über den gesamten Rf-Bereich verteilt (1, 2 = Chlorogensäure, 5 - 9, 11). Außerdem liegt zwischen Chlorogensäure und Vitexin noch eine schwache grüne (3) und eine rötliche (4) DC-Zone.

m) Fluorogramm von Fructus Crataegi (*Crataegus oxyacantha*)

Inhaltsstoffe: Ursol-, Oleanol-, Crataegol und andere Triterpensäuren, Hyperosid.

Das Chromatogramm zeigt vier kräftige Zonen. Zwei dieser Zonen weisen die typische blau-türkise Fluoreszenz der Pflanzensäuren auf (4, 1 = Chlorogensäure), während die beiden anderen Zone orange gefärbt sind (3, 2 = Hyperosid).

n) Fluorogramm von Gemmae Sophorae (*Sophora japonica* L.)

Inhaltsstoffe: Kämpferolglycoside, Kämpferol-C-Glycoside, Genisteinglykoside, Sophorabioside, Sophoraflavonolose, Sophoricoside, diverse Aglykone und vor allem Rutin. Die Blütenknospen von *Sophora* enthalten über 20% Flavonoide. Neuere Untersuchungen sprechen von einem Gesamtgehalt von 24,29% flavonoiden Substanzen und dabei 23,50% Rutinanteil<sup>109</sup>.

Das Chromatogramm ist dementsprechend von einem überdimensionalen Rutinfleck (5) geprägt. An der Front findet man das Aglykon Quercetin und über den gesamten Bereich verteilt weitere orange Substanzzonen.

o) Fluorogramm von Herba Centaurii (*Erythraea centaurium* L. = *Centaureum minus* M.)

Inhaltsstoffe: (keine Angaben über phenolische Inhaltsstoffe)

*Herba Centaurii*-Extrakte zeigen nach chromatographischer Auftrennung im unteren Teil des Chromatogramms mehrere orange Zonen (1, 3, 6 = Rutin) und grüne Zonen (2, 4, 5, 8).

p) Fluorogramm von Herba Rutae (*Ruta graveolens* L.)

Inhaltsstoffe: Furanocumarine, Cumarine, Rutin.

Bei *Herba Rutae* zeigt das Chromatogramm als einzigen orange fluoreszierenden Fleck Rutin (3). Die übrigen Flecke (5, 6, 7, 8) erscheinen mit der für Cumarinverbindungen charakteristischen blauen und Fleck (4) mit grüner Färbung.

g) Fluorogramm von Herba Violae (*Viola tricolor* L.)

Inhaltsstoffe: Anthocyanglykoside, Myricetin, Scoparin, Vitexin, Orientin, Isoorientin, Violaquercitrin (= Rutin).

In diesem Chromatogramm treten eine Reihe grüner Zonen auf (2 - 4, 6, 7) und außerdem findet man mehrere orange Zonen (1, 5 = Rutin, 8).

r) Fluorogramm von Pericarpium Aurantii (*Citrus aurantium* ssp. *aurantium* L.)

Inhaltsstoffe: Rhoifolin (Apigenin-7-hesperidosid), Hesperetin, Nobiletin, Tangeretin, Sinensitin, Naringenin, Auranetin, Hesperidin, Neohesperidin.

Pomeranzenschalen zeigen einen besonders auffälligen roten Fleck (4) dicht oberhalb der Rutinzone (3). Wir konnten diese DC-Zone als das von Horowitz und Gentili<sup>110)</sup> beschriebene Eriocitrin, ein Eriodictyol-7- $\beta$ -rutosid identifizieren. Diese Verbindung bildet mit DBAÄE einen besonders intensiv fluoreszierenden Chelat. Eriocitrin zeigt im Tageslicht eine violette Färbung und fluoresziert im UV-Licht (366 nm) leuchtend rot. Eriocitrin kommt nach den Literaturangaben nur noch in *Mentha longifolium*<sup>111)</sup> vor und kann deshalb als Erkennungsmerkmal für Pericarp- und Menthaextrakte Verwendung finden. Das DC-Bild der Extrakte aus Pomeranzenschalen zeigt noch zwei weitere schmutzig gelblichgrüne Zonen (5 = Hesperidin, 6 = Naringin).

s) Fluorogramm von Pericarpium Citri (*Citrus limon* L.)

Inhaltsstoffe: Neohesperidin, Naringenin-7-hesperidosid, Poncirin, Aureusidin-6-glucosid, Limocitrol, Limocitrol-3-glucosid, Limocitrin-3-glucosid, Limocitrin, Quercetin-3,5-diglucosid, Luteolin-7-rutosid, Aureusidin-6-rhamnoglucosid, Aureusidin, Eriocitrin, Hesperidin, Isorhamnetin-3-arabinoglucosid, Limocitrin-3-arabinoglucosid, Limocitrol-3-arabinoglucosid, Apigenin-C-Glykoside, Ferula-, Kaffee- und Paracumarsäure.

*Pericarpium Citri* zeigt ebenfalls den auffälligen Eriocitrin-Fleck (4) im mittleren Rf-Bereich, darunter die Rutinzone (3) und darüber Hesperidin (5).

t) Fluorogramm von Radix Arnicae (*Arnica montana* L.)

Inhaltsstoffe: Phenoläther, Gallussäure.

Arnikawurzel erkennt man an den intensiv türkis fluoreszierenden Zonen (1 - 5). Andersfarbige Zonen treten im Bild des Extraktes nicht auf.

8.                    WEITERE BEITRÄGE ZUR ANALYTIK PHENOLISCHER PFLAN-  
ZENINHALTSSTOFFE

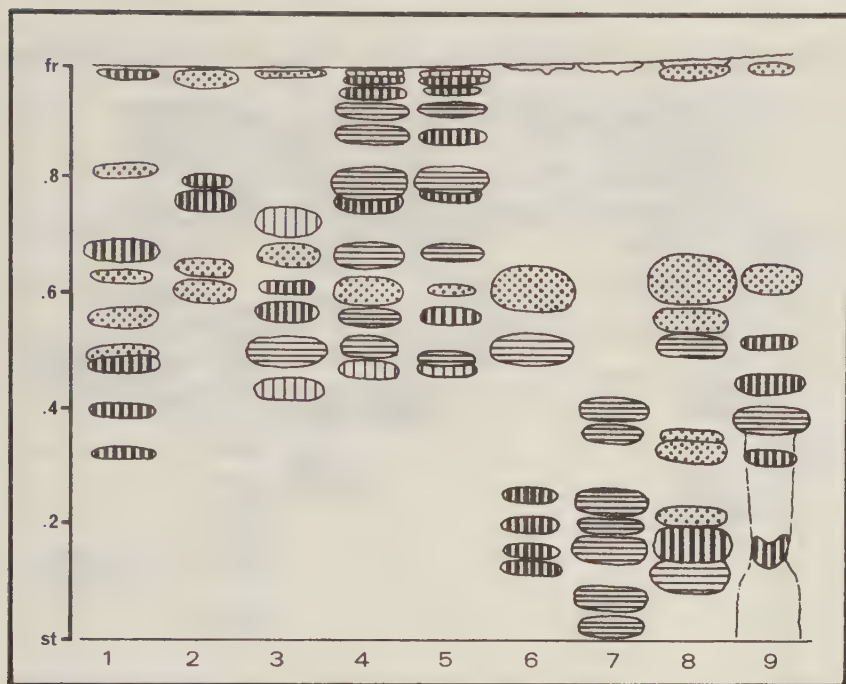
In der Praxis stehen die für eine fluorometrische DC-Direktauswertung erforderlichen Meßgeräte nicht immer zur Verfügung. Bei der Ausarbeitung der Fluorographie von Flavondrogen haben sich bei der Chromatographie eine Reihe von Verbesserungen ergeben, die auch für eine visuelle Chromatogrammauswertung genutzt werden können. Durch die Kombination von Diphenylborsäure- $\beta$ -aminoäthylester und Polyäthylenglykol 4 000 können die Verbindungen in extrem geringer Konzentration nachgewiesen werden. Die erforderlichen Substanzmengen pro Startzone können dementsprechend verringert werden und die Auflösung der Chromatogramme wird wesentlich verbessert. Darüber hinaus wird durch diese Detektionsmethode die Zuordnung der DC-Flecke erleichtert, weil farbliche Unterschiede zwischen verschiedenen Verbindungstypen deutlicher wahrnehmbar sind.

8.1.                IDENTIFIZIERUNG UND UNTERSCHIEDUNG EINIGER FLAVON-  
DROGEN DURCH VISUELLE AUSWERTUNG

An Hand von drei Farbphotographien<sup>\*)</sup> kann man die charakteristischen Unterschiede, die im Muster der phenolischen Inhaltsstoffe bei den einzelnen Drogen auftreten, gut erkennen. Die in der Abb. 21 a, b, c wiedergegebenen Chromatogramme vermitteln einen Eindruck, wie intensiv und farblich differenziert die einzelnen Flavonoide nach der Detektion fluoreszieren.

---

<sup>\*)</sup> Anmerkung: In der gedruckten Fassung dieser Arbeit können diese Photographien nur als Schemazeichnungen wiedergegeben werden; die gezeigten Chromatogramme wurden im Stadium der Vorversuche angefertigt, dadurch ergeben sich Abweichungen zu den unter den Fluorogrammen gezeigten DC-Skizzen, die dem chromatographischen Bild der Auftrennung unter Normbedingungen der Fluorographie entsprechen.



Fluoreszenzfarben:



blau



grün



türkis



orange



rot

Abb. 20a

Dünnschichtchromatogramm von Flavondrogenextrakten

|   |        |                  |
|---|--------|------------------|
| 1 | Radix  | Liquiritiae      |
| 2 | Folia  | Petasites        |
| 3 | Herba  | Rutae            |
| 4 | Flores | Tiliae (off.)    |
| 5 | Flores | Tiliae (arg.)    |
| 6 | Folia  | Hyoscyami (off.) |
| 7 | Folia  | Stramonii        |
| 8 | Folia  | Belladonnae      |
| 9 | Folia  | Hyoscyami (mut.) |

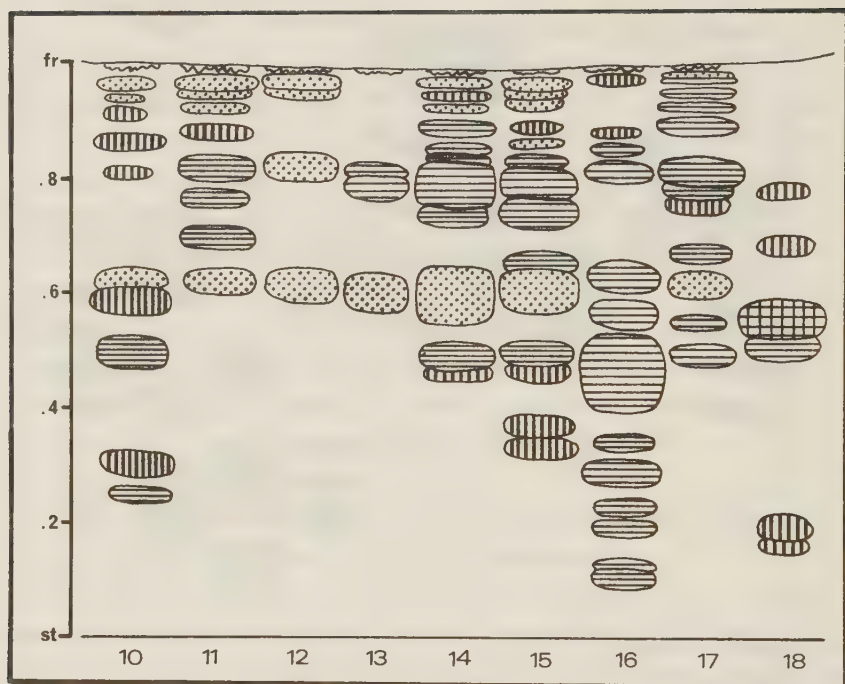


Abb. 20b

Dünnschichtchromatogramm von Flavondrogenextrakten

|    |             |               |
|----|-------------|---------------|
| 10 | Flores      | Calendulae    |
| 11 | Flores      | Arnicae       |
| 12 | Radix       | Arnicae       |
| 13 | Fructus     | Crataegi      |
| 14 | Flores      | Crataegi      |
| 15 | Folia       | Crataegi      |
| 16 | Gemmae      | Sophorae      |
| 17 | Flores      | Tiliae (off.) |
| 18 | Pericarpium | Citri         |

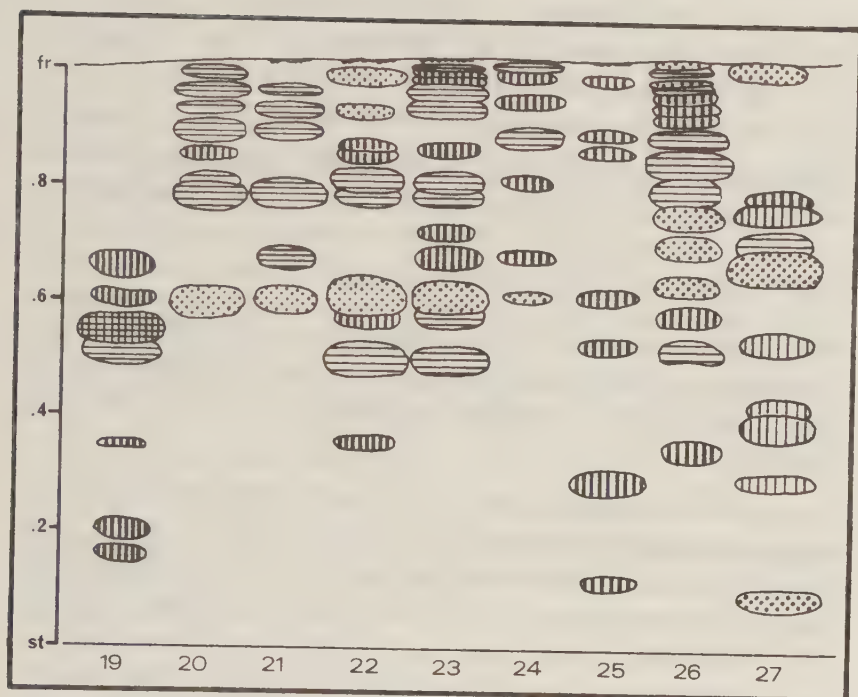


Abb. 20c

Dünnschichtchromatogramm von Flavondrogenextrakten

|    |             |                     |
|----|-------------|---------------------|
| 19 | Pericarpium | Aurantii            |
| 20 | Folia       | Juglandis           |
| 21 | Folia       | Betulae             |
| 22 | Flores      | Sambuci             |
| 23 | Flores      | Acaciae             |
| 24 | Flores      | Stoechados          |
| 25 | Flores      | Rubinae             |
| 26 | Flores      | Spireae             |
| 27 | Radix       | Pelargonii (renif.) |

Von den genannten Drogen kommt einer Differenzierung zwischen

- a) Flores Tiliae (off.) - Flores Tiliae (arg.)
- b) Flores Arnicae - Flores Calendulae
- c) Fructus - Flores - Folia Crataegi
- d) Pericarpium Citri - Pericarpium Aurantii

eine besondere Bedeutung zu. Auf die Durchführung der Unterscheidung ohne Verwendung spektralfluorometrischer Methoden soll kurz eingegangen werden.

zu a) Flores Tiliae (off.) - Flores Tiliae (arg.)

Die beiden Drogenextrakte sind in Abb. 20a dargestellt; der Extrakt mit Ziffer 4 wurde aus der offizinellen Droge (*Tilia cordata* M. und *Tilia platyphyllos* S.) hergestellt, der mit Ziffer 5 bezeichnete Extrakt aus *Tilia argentea* D. (syn. *Tilia tomentosa* M.) gewonnen.

Man erkennt in der Abbildung, daß eine Reihe von DC-Flecken übereinstimmend in beiden Drogenextrakten auftreten. Im Rf-Bereich zwischen 0,4 und 0,6 - also in dem Bereich, in dem man Rutin und Chlorogensäure findet - ergeben sich signifikante Unterschiede. Während die offizinelle Droge eine relativ hohe Konzentration an Rutin enthält (2. Fleck von unten), fehlt Rutin in der Verfälschung *Tilia argentea* völlig oder ist nur in geringer Konzentration enthalten. Dafür tritt in Extrakt 5 ein gleichfalls orange fluoreszierender Fleck dicht unterhalb des Rutins auf, der für die Verfälschung typisch ist. Auch in dem dritten Fleck von unten unterscheiden sich die beiden Drogen: Er ist bei der offizinellen *Tilia* orange, bei der Verfälschung grün fluoreszierend. Diesen Unterschied zeigt auch der 5. Fleck unterhalb der Front. Man kann daraus folgern, daß in der *Tilia argentea*-Droge vermehrt Kämpferolglykoside, die diese charakteristische grüne Fluoreszenz aufweisen, enthalten sind.

### zu b) Flores Arnicae – Flores Calendulae

Calendulablüten sind die häufigste Verfälschung von Arnikablüten. Das chromatographische Bild von Arnikablütenextrakten zeigt im unteren Drittel keine Substanzonen (s. Abb. 20b – Extrakt 11). Chlorogensäure tritt bei einem Rf-Wert von 0,6 als unterste Substanz auf. Darüber liegen mehrere orange und an der Front türkis fluoreszierende Zonen. Demgegenüber zeigt der Extrakt aus Flores Calendulae (Abb. 20b – Extrakt 10) zwischen der ebenfalls enthaltenen Chlorogensäure und der Laufmittelfront keine orange, dafür aber grün und türkis gefärbte Substanzflecke. Besonders charakteristisch sind jedoch die in Flores Calendulae enthaltenen höher glykosidierten Verbindungen, die in dem Bereich zwischen dem Startpunkt und der Chlorogensäure aufgetrennt werden. Bei diesen Zonen handelt es sich (mit steigenden Rf-Werten) um eine orange, eine grüne, eine orange und eine weitere grüne Zone. Diese Verbindungen ermöglichen die Feststellung von Spuren fremder Beimengung dieser Droge in Arnikablüten.

Von den beiden beschriebenen Extrakten kann ein Extrakt aus Radix Arnicae leicht unterschieden werden (s. Abb. 20b – Extrakt 12). Hier treten eine Reihe von kräftig grüntürkis bis türkis fluoreszierende DC-Flecke auf, die alle in der oberen Hälfte des Chromatogramms liegen.

### zu c) Fructus – Flores – Folia Crataegi

Die Extrakte aus Crataegusfrüchten erkennt man an zwei türkis fluoreszierenden Flecken (Abb. 20b – Extrakt 13). Der untere dieser Flecke ist die Chlorogensäure, der obere liegt unmittelbar unter der Fließmittelfront. Dazwischen findet man Hyperosid und eine weitere orange fluoreszierende Substanzzone direkt über Hyperosid. Die bei den Crataegusfrüchten beschriebenen Verbindungen sind auch in den Extrakten aus Crataegusblüten (Abb. 20b – Extrakt 14) und Crataegusblättern (Abb. 20b – Extrakt 15) enthalten. Man erkennt aber bei dem Extrakt aus Weißdornblättern außerdem zwei intensive grün fluoreszierende Zonen unterhalb des Rutins, einen gelbgrünen Fleck oberhalb der Chlorogensäure und einen sehr intensiven grünen Fleck unterhalb der starken Hyperosidzone, die bei Weißdornblüten nicht auftreten. Zur Unterscheidung der Crataegus-Blüten und -Früchte dient das Rutin, das in den Früchten nicht enthalten ist. Darüber hinaus treten bei Weißdorn-

blüten auch oberhalb von Hyperosid noch mehrere Flecke auf.

#### zu d) Pericarpium Citri - Pericarpium Aurantii

Die chromatographische Unterscheidung der beiden Pericarpiumdrogen (P. Citri s. Abb. 20b - Extrakt 18 und P. Aurantii s. Abb. 20c - Extrakt 19) erfolgt zweckmäßig vor dem Besprühen, da die Verbindungen Rutin und Eriocitrin im detektierbaren Chromatogramm in beiden Extrakten zu finden sind. Betrachtet man das DC unmittelbar nach der Entwicklung im UV-Licht (366 nm), so findet man bei Extrakten aus Pericarpium Aurantii mehrere hellblaue Zonen und einen blauvioletten Fleck im Frontbereich. Vier weitere Zonen mit dieser Farbe liegen im mittleren Rf-Bereich. Diese vier Zonen fehlen im Drogenextrakt von Pericarpium Citri. Hier treten nur einige blauviolette Zonen im oberen und unteren Drittel des Chromatogramms auf.

### 8.2. ENTWICKLUNG EINES MODIFIZIERTEN FLIESSMITTELSYSTEMS ZUR CHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG UNPOLARER FLAVON- GLYKOSIDE

Das von Steinegger für die Trennung vorgeschlagene Laufmittel (Äthylacetat/Ameisensäure/Wasser = 10:2:3) ist als universell verwendbares System für die Fluorographie optimal geeignet. Treten jedoch bei einem Pflanzenextrakt vermehrt unpolare Verbindungen auf, so kommt es zu einer Häufung von Substanzzonen im oberen Drittel des Chromatogramms. In vielen Fällen ist eine bessere Trennung dieser Verbindungen wünschenswert. Wir haben deshalb an Hand eines Kamillenblütenextrakts untersucht, ob durch die Änderung der Mengenverhältnisse der Komponenten dieses Fließmittels die Trennung vorwiegend unpolarer Komponenten verbessert werden kann. Zur Demonstration der Auflösung der einzelnen Substanzzonen unter verschiedenen Entwicklungsbedingungen bedient man sich mit Vorteil der DC-Direktauswertung. Die Ortskurve zeigt nicht nur die Lage der einzelnen Flecke, sondern auch deren Auflösung.

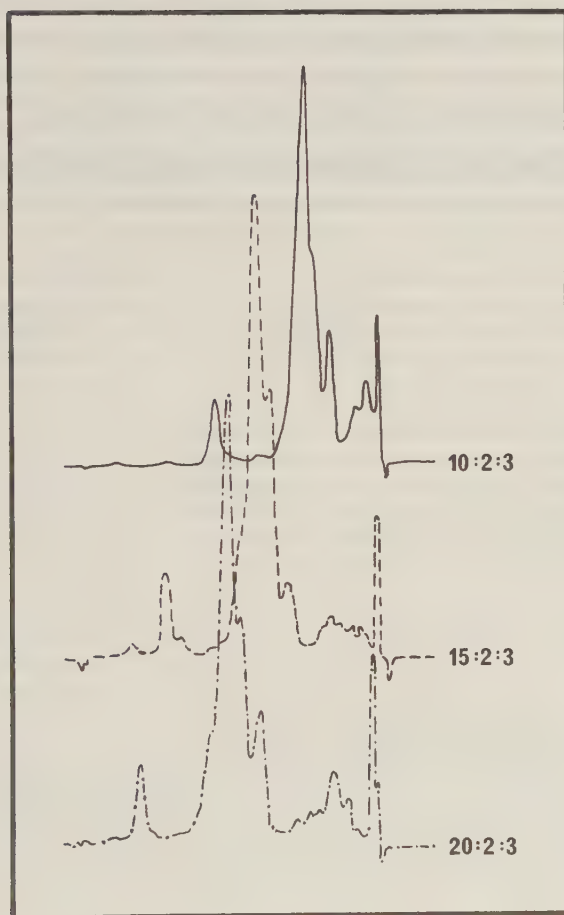


Abb. 22

Fluoreszenzortskurven eines Kamillenblütenextrakts  
unter Variation der Laufmittelzusammensetzung

Man erkennt aus Abb. 22 deutlich, daß mit Erhöhung des Äthylacetatgehaltes die chromatographische Trennung des Extraktes besser wird. Bei der Fließmittelvariante mit Äthylacetat/Ameisensäure/Wasser = 20:2:3 (V/V/V) ist die Grenze erreicht, bis zu der eine Mischung der Komponenten möglich ist. Erhöht man den Gehalt an Äthylacetat weiter, so kommt es zu einer Phasentrennung.

Wir empfehlen deshalb für die Chromatographie unpolarer Flavonglykoside und verwandter Verbindungen das oben beschriebene Fließmittel.

## ZUSAMMENFASSUNG

---

- 1) Für die antihepatotoxisch wirksame Gruppe der Silymarine (Flavonoligane) wurde eine fluorometrische Wertbestimmungsmethode entwickelt, die eine quantitative Bestimmung der einzelnen Komponenten in Extrakten und Arzneispezialitäten erlaubt. Die Wertbestimmung ergab erhebliche Unterschiede in der Zusammensetzung des Silymarinkomplexes in Abhängigkeit von der Herkunft der Droge.
- 2) Im Zusammenhang mit der DC-Direktauswertung wurde ein neues Fließmittel entwickelt, das eine bessere Trennung der Silymarine auf Kieselgel gestattet. Mit diesem Trennmittel gelang es, weitere Verbindungen der Silymaringruppe, die bisher in der Literatur noch nicht bekannt waren, aufzufinden.
- 3) Die Nachweisempfindlichkeit von Pyronverbindungen konnte durch Nachbesprühen der mit Diphenylborsäure- $\beta$ -aminoäthylester angefärbten Verbindungen mit Polyäthylenglykollösung erhöht werden, sodaß ihre fluorometrische Bestimmung noch im Nannogrammbereich durchführbar ist. Die möglichen Mechanismen, die diesem Effekt zugrunde liegen können, wurden diskutiert. Es dürfte sich um einen physikalisch-chemischen Vorgang (Desorption) handeln.
- 4) Als Beispiel für eine Absolutbestimmung flavonoider Substanzen in Drogenextrakten und anderen Zubereitungen wurde eine fluorometrische Bestimmung von Rutin im Nannogrammbereich ausgearbeitet.
- 5) Für die Flavondrogen wurde eine neue Standardisierungsmöglichkeit entwickelt, indem die chromatographisch getrennten phenolischen Verbindungen nach Detektion durch eine polyspektrale Fluorographie erfasst wurden. Die auf diese Weise erhaltenen Fluorogramme können gleichzeitig zur Dokumentation dienen. Sie stellen außerdem eine neuartige Methode zur Identitäts- und Reinheitsprüfung von Flavondrogen dar.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### A) ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN

1. Dünnschichtchromatographie
  - 1.1. Sorptionsmittel
    - 1.1.1. Kieselgel: Für alle chromatographischen Untersuchungen mit Kieselgel als stationärer Phase wurden Kieselgel-60-Fertigplatten F 254, Format 20 x 20 cm (Chargennummern ohne X) der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet.
    - 1.1.2. Polyamid: Polyamid G 1600 - Fertigplatten, Format 20 x 20 cm der Fa. Schleicher und Schüll, Dassel
    - 1.1.3. Mikropolyamid: Mikropolyamid-Fertigfolien F 1700 der Fa. Schleicher und Schüll, Dassel
    - 1.1.4. Cellulose: Cellulose-Fertigplatten, Format 20 x 20 cm der Fa. Merck, Darmstadt
  - 1.2. Fließmittelsysteme
    - 1.2.1. Silymarine auf Kieselgel
      - 1.2.1.1. eindimensionale Entwicklung und 1. Entwicklung bei zweidimensionaler Trennung: Chloroform/Aceton/Ameisensäure = 9:2:1 (V/V/V)
      - 1.2.1.2. 2. Entwicklung bei zweidimensionaler Trennung: Chloroform/Methanol/Ameisensäure = 5:1:1 (V/V/V)
    - 1.2.2. Silymarine auf Mikropolyamid: Chloroform/Methyläthylketon/Methanol/Ameisensäure = 70:20:7:5 (V/V/V/V)
    - 1.2.3. Silymarine auf Polyamid: Chloroform/Methanol/Ameisensäure = 75:30:5 (V/V/V)
    - 1.2.4. Silymarine auf Cellulose: Essigsäure/Wasser = 15:85 (V/V)
    - 1.2.5. Flavonglykoside auf Kieselgel: Äthylacetat/Ameisensäure/Wasser = 10:2:3 bzw. 15:2:3 bzw. 20:2:3 (V/V/V)

### 1.3. Detektionsreagentien

- 1.3.1. Diphenylborsäure- $\beta$ -aminoäthylester: (DBAÄE, Naturstoffreagenz nach Neu) Man verwendet eine 1%ige Lösung (G/V) von Diphenylborsäure- $\beta$ -aminoäthylester in Methanol. Die Lösung muß nicht, wie die Literatur angibt, vor der Verwendung frisch hergestellt werden, sondern kann bei ca. 5<sup>0</sup> C und unter Lichtausschluß mehrere Wochen aufbewahrt werden.
- 1.3.2. Polyäthylenglykol 4 000: Man verwendet eine 5%ige Lösung (G/V) in Äthanol, die unter Erwärmen hergestellt wird.
- 1.3.3. Aluminiumchlorid: Man verwendet eine 1%ige Lösung (G/V) von Aluminiumchlorid in Äthanol.
- 1.3.4. bas. Bleiacetat: Man verwendet eine 25%ige Lösung (G/V) von Blei(II)-acetat (R 84) in Wasser.

### 1.4. Standardisierte Dünnschichtchromatographie:

Die chromatographischen Trennungen werden einheitlich nach dem nachfolgenden Schema durchgeführt. Soweit von diesen Standardbedingungen abgewichen wird, werden bei den einzelnen Arbeitsvorschriften entsprechende Hinweise gegeben.

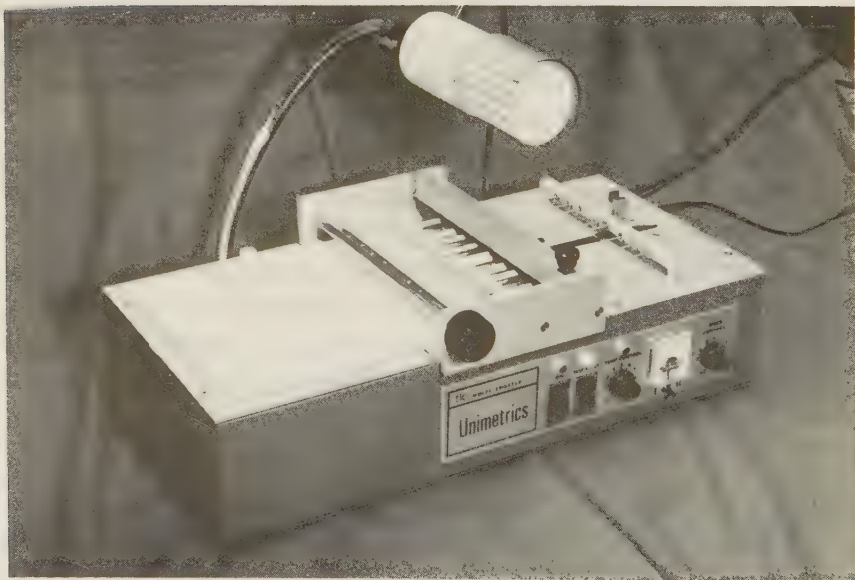
- 1.4.1. Stationäre Phase: Es werden Kieselgel-Fertigplatten im Format 20 x 20 cm mit einer 0,25 mm dicken Schicht verwendet. Da zu diesen Untersuchungen verwendete Kieselgel 60 wurde in der Zwischenzeit vom Hersteller in seinen Eigenschaften verändert; mit Veränderungen der R<sub>f</sub>-Werte muß gerechnet werden; auf jeden Fall verkürzen sich die Laufzeiten gegenüber den im Text angegebenen Werten.
- 1.4.2. Aktivierung: Die Platten werden vor dem Entwicklungsvorgang nicht aktiviert. Die Aufbewahrung erfolgt bei 20<sup>0</sup> C und 50% rel. Luftfeuchtigkeit, wobei die Sorbensschicht durch eine Glasplatte abgedeckt wird.
- 1.4.3. Entwicklungskammer: Zur Chromatographie werden ausschließlich Kammern zur Aufnahme von DC-Platten 20 x 20 cm verwendet, die eine zur Kammerinnenwand parallele Stellung der Platten gewähr-

leisten (z.B. Simultan-Trennkammer I der Fa. Desaga, Heidelberg). In jeder Kammer wird jeweils nur eine DC-Platte entwickelt. Dabei wird die Platte so eingestellt, daß die Trägerglasscheibe 1,5 - 2,0 cm von der Innenseite der Kammer entfernt ist und die Sorbenschicht zur Kammermitte gerichtet ist.

- 1.4.4. Entwicklungshöhe: Die Laufhöhe beträgt einheitlich 15,0 cm. Die Startlinie wird 1,5 cm vom unteren Plattenrand entfernt markiert. Im Abstand von 15,0 cm zur Startlinie wird die Sorbenschicht vorsichtig durchtrennt. Man erreicht so eine über die gesamte Plattenbreite gleichbleibende Laufstrecke. Diffusionsvorgänge im Frontbereich sind dabei nicht zu vermeiden, jedoch ist ihr negativer Einfluß auf die Chromatographie verglichen mit den Störungen durch differierende Entwicklungshöhen zu vernachlässigen.
- 1.4.5. Auftragevorgang: 10 µl Untersuchungslösung werden bandförmig (20 x 3 mm) aufgetragen. Zu diesem Zweck bedient man sich mit Vorteil eines Cordis-Mikroapplikators, womit eine homogene Substanzverteilung entlang der Startlinie erreicht wird. Der Abstand der Startzonen zur Plattenaußenkante beträgt 1,5 cm, der Abstand zwischen den einzelnen Startzonen 0,5 cm. Bei dieser Einteilung können sieben Startzonen aufgetragen werden.
- 1.4.6. Bedingungen im Arbeitsraum: Alle Arbeiten werden in einem klimatisierten Raum bei 20 °C und 50% rel. Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Äquilibration, Entwicklung, Trocknung, Ausgleichsphase und Aufbewahrung nach der Detektion erfolgen außerdem unter Lichtabschluß.
- 1.4.7. Mobile Phase: Die Flüssigkeitsvolumina werden mit einer Genauigkeit von 1% abgemessen. Grundsätzlich werden für alle Fließmittel analysenreine Lösungsmittel verwendet. Vom gut gemischten Laufmittel werden 100,0 ml abgemessen und vorsichtig auf dem Boden des Entwicklungstanks ausgegossen. Darauf wird im Normalfall (Arbeiten ohne Kammersättigung) die DC-Platte eingestellt und die Kammer verschlossen.

- 1.4.8. Sättigung: Ist eine Sättigung erforderlich, so wird die DC-Platte erst nach der angegebenen Zeit in die Kammer eingestellt. Wegen der geringen Reproduzierbarkeit werden keine zusätzlichen Maßnahmen, wie Einlegen von Filtrierpapier, Bewegen der Kammer usw. ergriffen.
- 1.4.9. Äquilibration: Die DC-Platten werden nach dem Auftragevorgang 15 Minuten bei Normalbedingungen (s. 1.4.6.) aufbewahrt, damit Reste des Lösungsmittels der Untersuchungslösung abdampfen können.
- 1.4.10. Entwicklung: Die Entwicklung erfolgt über die angegebene Laufstrecke von 15 cm.
- 1.4.11. Trocknung: Die entwickelten Chromatogramme werden im Trockenschrank bei 105°C 5 Minuten lang getrocknet. Eine vollständige Entfernung des Laufmittels ist nicht erforderlich. (Bei der Detektion mit DBAÄE empfehlen Bourwieg und Pohl ein Besprühen mit 15%iger Essigsäure und dann mit Naturstoffreagenz<sup>111</sup>.)
- 1.4.12. Detektion: Das Chromatogramm wird gleichmäßig mit dem Detektionsreagenz besprüht, wobei darauf zu achten ist, daß die Sorbenschicht nicht durchnässt wird.
- 1.4.13. Ausgleichsphase: Wird mit dem Sprühvorgang nicht sofort die optimale Detektion erreicht, so wird die DC-Platte mit einer gleich großen Glasplatte abgedeckt und 20 Stunden unter Normbedingungen aufbewahrt. Danach erfolgt die visuelle oder spektrofluorometrische Auswertung.
- 1.5. Auftragegeräte für die DC
- 1.5.1. Bandförmiges Auftragen: Die Untersuchungslösungen werden mit einem Cordis-Mikroapplikator 10 µl (für organische Lösungsmittel) aufgetragen (Vertr. Fa. W. Pabisch, München).
- 1.5.2. Punktförmiges Auftragen: Für quantitative Bestimmung ist es unbedingt erforderlich, Startpunktgröße und Auftragevolumen exakt reproduzieren zu können. Zu diesem Zweck benutzten wir den Linomat II der Fa. Camag, Muttens (Schweiz), der aber nicht zufriedenstellend

arbeitete. Deshalb wurden alle quantitativen Untersuchungen mit Hilfe des UNIMETRICS-TLC-MULTISPOTTER (Vertr. Fa. Macherey und Nagel, Düren) durchgeführt, der wesentlich schneller und genauer die Untersuchungslösungen auf die Platte applizierte. Es wurden jeweils achtmal  $50\text{ }\mu\text{l}$  mit einer teflonisierten Spezialspritze auf der Startlinie mit einem Abstand von 19 mm aufgetragen. Bei einer Kolbenvorschubgeschwindigkeit von 5, einer Plattenvorheizung von  $45^{\circ}\text{C}$  und ohne Benutzung des Radialgebläses erhielten wir Startpunkte von 3 mm Durchmesser.



2. Beschreibung der Meßgeräte
  - 2.1. UV-Absorptionsmessung
    - 2.1.1. UV-Spektren wurden mit dem UV-Spektrometer DK-2 A der Fa. Beckman aufgenommen.
    - 2.1.2. UV-Absorptionsmessungen zur Bestimmung der Extinktion wurden mit einem Hitachi UV-Vis Spectrometer 181-6 durchgeführt.
  - 2.2. Fluoreszenzmessungen: Alle qualitativen und quantitativen Messungen wurden mit einem Fluorescence Spectrophotometer MPF-3 der Fa. Perkin-Elmer, vertr. d. Fa. Bodenseewerk, Überlingen, ausgeführt, das mit einem QPD-33 Schreiber (Zweikanal) und einem TLC-Scanner mit Transmissions- und Remissionsmeßmöglichkeit ausgestattet war.
  - 2.3. Flächenintegration: Die Integration der Fluoreszenzortskurven wurde mit einem Speicher-Integrator SIP-1 der Fa. Perkin-Elmer durchgeführt.
  - 2.4. Verarbeitung der Digitalwerte: Die vom Integrator ausgedruckten Digitalwerte wurden mit dem elektronischen Tischcomputer Programma 101 der Fa. Olivetti ausgewertet. Die dazu erforderlichen Rechenprogramme wurden auf Magnetprogrammkarten abgespeichert. Während für die Ermittlung der statistischen Größen ein Standardrechenprogramm der Fa. Olivetti verwendet wurde, wurde das Programm für die Aufstellung der Regressionsgerade selbst entwickelt.

## B) SPEZIELLE ARBEITSMETHODEN

3. Herkunft der untersuchten Drogen und Arzneyspezialitäten
  - 3.1. Untersuchung von Mariendistelfrüchten: Die untersuchten Drogen stammten aus Institutsbeständen, von der Fa. Madaus, Köln (mit den Chiffren B37/2229S, B66/3000S, B72/4514S, B73/3253S, B82/2996S, B85/2800S, B86/1199S, B89/3030S), aus dem Versuchsanbau der

Arbeitsgemeinschaft für Arzneipflanzenanbau (s. Jahresbericht 1972, Ziff. 2.5.) und aus dem Pharmagroßhandel. Die Herkunft der Drogenmuster ist bekannt.

- 3.2. Untersuchung von Silymarin-Spezialitäten: Bei der quantitativen Bestimmung von Silymarinen in Handelspräparaten wurden Legalon<sup>o</sup> Drag. der Fa. Madaus, Köln, und Silymarin Kaps. der Fa. Dura-Chemie, Rottach-Egern, verwendet, die einen deklarierten Gehalt von 35 mg Silymarin pro Drag. bzw. Kaps. hatten.
- 3.3. Untersuchung einer Rutin-Spezialität: Wir untersuchten Nitroglin<sup>o</sup> Tabl. der Fa. Protina, München, deren Zusammensetzung mit Nitroglycerin 0,5 mg, Pentaerythroltetranitrat 8 mg, Mannitolhexanitrat 10 mg, Rutin 10 mg und organische Magnesiumsalze 60 mg angegeben wird.
- 3.4. Untersuchung von Flavondrogen: Die Drogen stammen aus Institutsbeständen; ihre Herkunft ist bekannt; sie wurden pharmakognostisch hinsichtlich ihrer Identität überprüft.
4. Herstellung der Untersuchungslösungen
- 4.1. Herstellung der Untersuchungslösungen für die Analytik der Silymarine:
  - 4.1.1. Herstellung der Drogenextrakte: 1,00 g gepulverte Droge (Sieb Nr. 180 ISO-Nov. 1964, Europ. Arzneibuch; entspricht etwa der Siebgröße 6; DAB 7, fein gepulverte Droge) wird im Soxhlet 4 Stunden mit Petroläther extrahiert. Durch Eindampfen des Extraktes wird der petrolätherlösliche Anteil erhalten. Nach Entfernen des Petroläthers wird der Drogenrückstand 5 Stunden lang mit Methanol im Soxhlet extrahiert. Der Rückstand dieser Extraktionslösung entspricht dem methanollöslichen Anteil. Der Rückstand wird in Methanol aufgenommen, in einen 50 ml Meßkolben überführt und bis zur Marke mit Methanol aufgefüllt. Die erhaltene Lösung dient als Untersuchungslösung. Sie kann, falls nötig, durch Filtration durch ein Membranfilter mit 1,5  $\mu$  Porenweite von Schwebestoffen befreit werden.

Für qualitative Untersuchungen werden 10 - 50 µl strichförmig aufgetragen (Detektion DBA-ÄE + PEG). Werden dagegen Chromatogramme durch Absorptionsmessung oder Messung der Fluoreszenzminderung ausgewertet, so wird der methanollösliche Anteil zu 5,00 ml gelöst. Für quantitative Untersuchungen wird der methanollösliche Anteil zu 50,00 ml gelöst, dann werden dieser Lösung einmal 2,00 ml und dreimal 3,00 ml entnommen, in jeweils einen 50 ml Meßkolben pipettiert und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Von diesen vier Prüflösungen werden jeweils 50 µl punktförmig aufgetragen.

#### 4.1.2. Herstellung der Extrakte aus Spezialitäten

4.1.2.1. Legalon<sup>®</sup> Drag.: 10 Drag. werden fein pulverisiert (Sieb 180) und im Soxhlet 5 Stunden mit Methanol extrahiert. Der Rückstand dieser Lösung wird in Methanol aufgenommen, quantitativ in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Dieser Extraktionslösung werden viermal 1,00 ml entnommen und auf 50,00 ml mit Methanol verdünnt. Diese Lösungen dienen als Untersuchungslösung.

4.1.2.2. Silymarin Kapsel, Durachemie: Die Kapseln enthalten ein Pflanzenrohmaterial, das vom Fettanteil und anderen Begleitstoffen nicht befreit wurde. Es ist deshalb erforderlich, die Kapselmasse mit Petroläther und anschließend mit Methanol zu extrahieren. 10 Kapseln werden vorsichtig geöffnet und Kapseln und Kapselinhalt in eine Soxhlet-hülse überführt. Danach verfährt man wie unter 4.1.1. beschrieben. Der methanollösliche Anteil wird dann in Methanol gelöst, quantitativ in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Analog 4.1.2.1. werden viermal je 1,00 ml entnommen, auf 50,00 ml aufgefüllt und als Untersuchungslösungen aufgetragen.

#### 4.2. Herstellung der Untersuchungslösungen für die Analytik von flavonoiden Pflanzeninhaltsstoffen:

4.2.1. Herstellung der Untersuchungslösung aus einer rutinhaltigen Spezialität (Nitroglin<sup>®</sup>): 10 Tabl., fein gepulvert (Sieb 180), werden dreimal mit jeweils 25 ml Methanol am Rückfluß extrahiert. Die ver-

einigten Extraktionslösungen werden filtriert, in einen 100 ml Meßkolben überführt und bis zur Marke mit Methanol aufgefüllt. Von dieser Lösung werden viermal 1,00 ml entnommen und auf 100,00 ml mit Methanol ergänzt; diese Lösungen dienen als Untersuchungslösungen.

## 5. Dünnschichtchromatographische Trennungen

### 5.1. DC der Silymarine

#### 5.1.1. Eindimensionale DC der Silymarine:

Sorbens: Kieselgel-60-Fertigplatte

Laufmittel: Chloroform/Ameisensäure/Aceton = 9:2:1

Sättigung: 12 Stunden

Entwicklungshöhe: zweimal 15 cm; zwischen der ersten und zweiten Entwicklung wird die Platte mit einem Kaltluftgebläse getrocknet bis die Schicht an keiner Stelle mehr transparent ist und erneut im gleichen Entwicklungstank über 15 cm entwickelt.

Laufzeit: 1. Entwicklung ca. 2,5 Stunden

2. Entwicklung ca. 2 Stunden

Detektion: Die bei 105<sup>0</sup> C getrocknete Platte wird noch warm mit der DBAÄE-Lösung und der PEG-4000 Lösung besprüht.

Ausgleichszeit: Das besprühte Chromatogramm wird mindestens 2 Stunden, besser aber 20 Stunden nach Ziffer 1.4.13 aufbewahrt.

Auswertung: Das Chromatogramm wird im UV-Licht (366 nm) betrachtet.

#### 5.1.2. Zweidimensionale DC der Silymarine:

Sorbens: Kieselgel-60-Fertigplatte

Laufmittel: Chloroform/Aceton/Ameisensäure = 9:2:1

(1. Dimension)

Chloroform/Methanol/Ameisensäure = 5:1:1

(2. Dimension)

Entwicklungshöhe: 12 cm in der ersten Dimension, danach wird die Platte um 90<sup>0</sup> gewendet und in der zweiten Dimension ebenfalls 12 cm entwickelt.

Sättigung: Man arbeitet ohne Kammersättigung.

Vergleichslösungen: Die Vergleichslösungen werden jeweils zweimal, wie aus der Abb. 16 zu ersehen ist, auf dem Chromatogramm placiert.

#### 5.1.3. DC der Silymarine auf Mikropolyamid:

Sorbens: Mikropolyamid F 1700

Laufmittel: Chloroform/Methyläthylketon/Methanol/Ameisensäure  
= 70:20:7:5

Sättigung: Man arbeitet ohne Kammersättigung

Entwicklungshöhe: 10 cm

Detektion: s. 5.1.1.

#### 5.1.4. Bestimmung der Nachweisgrenzen für Silybin auf verschiedenen stationären Phasen:

##### Kieselgel

Laufmittel: Chloroform/Aceton/Ameisensäure = 9:2:1

Sättigung: Man arbeitet ohne Kammersättigung.

Entwicklungshöhe: 15 cm

Detektion: jeweils eine Platte mit Aluminiumchlorid, Naturstoffreagenz und Naturstoffreagenz mit PEG 4000.

Auswertung: Als minimale, nachweisbare Konzentration wird die Konzentration angegeben, die mit dem an Dunkelheit adaptierten Auge erfassbar ist.

##### Cellulose

Laufmittel: Essigsäure/Wasser = 15:85.

Alle anderen Schritte erfolgen wie unter Kieselgel beschrieben.

##### Polyamid

Laufmittel: Chloroform/Methanol/Ameisensäure = 75:30:5

Alle übrigen Schritte erfolgen wie unter Kieselgel beschrieben.

Auftragsmengen: punktförmig jeweils 10 µl mit 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 25; 50; 75; 100; 250; 500; 750 und 1000 ng Silybin.

#### 5.1.5. DC der Silymarine zur fluorometrischen Direktauswertung:

Sorbens: Kieselgel 60-Fertigplatte 20 x 20 cm

Laufmittel: Chloroform/Aceton/Ameisensäure = 9:2:1

Sättigung: Man arbeitet ohne Kammersättigung.

Entwicklungshöhe: 15 cm

Detektion: s. 5.1.1.

Ausgleichszeit: 20 Stunden

Auftragevorgang: Auf der Startlinie (s. 1.4.4.) werden mit Hilfe des TLC-Multispotters acht Startpunkte im Abstand von 19 mm aufgetragen. Das Auftragevolumen beträgt 50 µl. Die Startpunkte werden alternierend mit Untersuchungs- und Vergleichslösung belegt. Fleck 1 wird mit 200 ng Silybin, Fleck 3 mit 400 ng, Fleck 5 mit 600 ng und Fleck 7 mit 800 ng belegt. Auf Fleck 2 wird die Untersuchungslösung 2,00/50,00 ml (s. 4.1.1.) und auf den Flecken 4, 6, 8 die Untersuchungslösungen 3,00/50,00 ml aufgetragen. Ausgewertet werden die Bahnen 1 - 8 mit Ausnahme der Bahn 2, die als Vergleichsbahn für Drogenextrakte mit sehr hohem Silybingehalt dient.

5.2.

DC der Flavondrogen:

Sorbens: Kieselgel 60-Fertigplatte

Laufmittel: Äthylacetat/Ameisensäure/Wasser = 10:2:3

Sättigung: 1 Stunde

Entwicklungshöhe: 15 cm

Detektion: s. 5.1.1.

Auftragevolumen: 10 µl, bandförmig 20 x 3 mm

Vergleichslösung: 3 mg Kämpferol-3-sophorosid, 3 mg Rutin, 1 mg Chlorogensäure, 5 mg Hyperosid, 5 mg Vitexin und 1 mg Scopoletin werden zu 100,00 ml mit Methanol gelöst.

5.3.

DC von Rutin zur fluorometrischen Direktauswertung:

Sorbens: Kieselgel 60-Fertigplatte

Laufmittel: Äthylacetat/Ameisensäure/Wasser = 10:2:3

Sättigung: 1 Stunde

Entwicklungshöhe: 15 cm

Detektion: s. 5.1.1.

Ausgleichszeit: 20 Stunden

Auftragevorgang: entsprechend 5.1.5.

## 6. Fluorometrische Größen

6.1. Qualitative Untersuchungen (Aufnahme von Ortskurven, Vergleich von Direktauswerteverfahren und Fluorographie)

| Untersuchte Substanz | Aufnahmebedingungen | Excitationswellenlänge | Bandbreite | Emissionswellenlänge | Bandbreite | Transmissions-Empfänger | Verstärkung | Blende | Scannervorschub | Schreiber-vorschub |
|----------------------|---------------------|------------------------|------------|----------------------|------------|-------------------------|-------------|--------|-----------------|--------------------|
| Silymarine           | F/R                 | 450                    | 8          | 510                  | 8          | -                       | 0,1         | 1x6    | high            | medium             |
| Silymarine           | F/T                 | 450                    | 2.5        | -                    | -          | F 500/2                 | 0,1         | 1x6    | high            | medium             |
| Silymarine           | A/R                 | 300                    | 2.5        | 300                  | 2.5        | -                       | 0,3         | 1x6    | high            | medium             |
| Silymarine           | A/T                 | 300                    | 2.5        | -                    | -          | ohne F/2                | 0,1         | 1x6    | high            | medium             |
| Silymarine           | FM/R                | 254                    | 10         | 512                  | 10         | -                       | 0,3         | 1x6    | high            | medium             |
| Silymarine           | FM/T                | 254                    | 3          | -                    | -          | F 470/1                 | 0,3         | 1x6    | high            | medium             |
| Taxifolin            | F/R                 | 450                    | 8          | 558                  | 8          | -                       | 0,1         | 1x6    | high            | medium             |
| Rutin                | F/R                 | 468                    | 10         | 554                  | 10         | -                       | 0,1         | 1x6    | high            | medium             |
| Fluoro-              | F/R                 | 366                    | 10         | 450                  | 10         | -                       | 1-1         | 1x6    | high            | medium             |
| graphie              | F/R                 | 450                    | 10         | 510                  | 10         | -                       | 1-3         | 1x6    | high            | medium             |
|                      | F/R                 | 450                    | 10         | 580                  | 10         | -                       | 1-1         | 1x6    | high            | medium             |

Zeichenerklärung: F Aufnahme der Fluoreszenz  
 A Aufnahme der Absorption  
 FM Aufnahme der Fluoreszenzminderung  
 R Remissionsanordnung  
 T Transmissionsanordnung  
 F 500/2 Kantenfilter, durchlässig von 500 - 3000 nm;  
 mit der Einstellung Sensitivity Control am  
 Interconnection Unit = 2

|                                  | SILYMARINE                                                        | RUTIN  |      |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------|------|
| MPF - 3 : Excitationswellenlänge | 450                                                               | 468    | (nm) |
| Bandbreite                       | 8                                                                 | 8      | (nm) |
| Emissionswellenlänge             | 510                                                               | 554    | (nm) |
| Bandbreite                       | 8                                                                 | 8      | (nm) |
| Sensitivity                      | 0,1-0,3                                                           | 0,1    |      |
| Blende                           | 1x6                                                               | 1x6    | (mm) |
| TLC-Scanner Vorschub             | High                                                              | High   |      |
| QPD-33 Vorschub                  | Medium                                                            | Medium |      |
| Zero-Suppression                 | mit einem ZS-Pot. = 250 K $\Omega$<br>(konstr. Änderung am MPF-3) |        |      |
| Response                         | Fast                                                              | Fast   |      |
| Mode                             | Sample                                                            | Sample |      |
| Reference Sensitivity            | Direct                                                            | Direct |      |

Zur Integration des Meßsignals wurde der Ausgang des Fluorescence Spectrophotometer MPF-3 mit dem Eingang eines Speicher-Integrators SIP-1 verbunden. Das reduzierte Ausgangssignal und die Integrationsmarkierungen wurden dem Schreiber QPD-33 zugeführt. Die Peakflächen wurden digital ausgedruckt.

|         |                      |                      |
|---------|----------------------|----------------------|
| SIP-1 : | Verzögerung          | 0                    |
|         | Schwelle             | 1,0                  |
|         | min. Peakfläche      | 400                  |
|         | max. Drift           | 0,015                |
|         | Betriebsart          | 2                    |
|         | Filter               | 1                    |
|         | Zählrate             | 1000                 |
|         | Basislinienkorrektur | "Ein"                |
|         | Ausgang              | lin. Recorder<br>(5) |

## 7. Chemikalien und Vergleichssubstanzen

7.1. Chemikalien:

|                                        |                                        |
|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Aceton                                 | R 5 DAB 7                              |
| Äthanol                                | R 10 DAB 7                             |
| Äthylacetat                            | R 18 DAB 7                             |
| Aluminiumchlorid                       | Merck 1080                             |
| Ameisensäure                           | R 32 DAB 7                             |
| Bleiacetat                             | R 84 DAB 7                             |
| Chloroform                             | R 129 DAB 7                            |
| Diphenylborsäure-<br>β-aminoäthylester | Roth 2-9920                            |
| Essigsäure                             | R 166 DAB 7                            |
| Methanol                               | R 268 DAB 7                            |
| Methyläthylketon                       | = Äthylmethylketon Merck 9708          |
| Petroläther                            | = Benzin R 79 DAB 7                    |
| 4 000                                  | Monographie "Polyäthylenglykole" DAB 7 |
| Polyäthylenglykol                      |                                        |

7.2. Chromatographische Vergleichssubstanzen:

|                            |                                                                            |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Chlorogensäure             | Roth 2-6385                                                                |
| Dehydrosilybin             | isoliert                                                                   |
| Hyperosid                  | Roth 2-7932                                                                |
| Hydnocarpin                | isoliert                                                                   |
| Luteolin                   | isoliert                                                                   |
| Kämpferol-3-<br>sophorosid | synth. (Vorschrift: <sup>112)</sup> )                                      |
| Rutin                      | Merck 500017                                                               |
| Scopoletin                 | Roth 2-7208                                                                |
| Silybin                    | rein, krist., Berochemie, Kelkheim<br>(Gemisch aus Silybin und Isosilybin) |
| Silybin                    | isoliert                                                                   |
| Silychristin               | isoliert                                                                   |
| Silydianin                 | isoliert                                                                   |
| Vitexin                    | Roth 2-9666                                                                |

Alle Substanzen wurden durch chromatographische Methoden auf ihre Eignung als DC-Vergleichssubstanzen untersucht.

### 7.3. Bezugssubstanzen für quantitative, fluorometrische Bestimmungen

#### 7.3.1. Silybin

Die Reinsolierung des Silybins erfolgte aus einem Konzentrat, das aus Mariendistelfrüchten hergestellt worden war. Das gewonnene Rohsilybin wurde durch mehrfaches Umkristallisieren gereinigt und im Hochvakuum  $120^{\circ}\text{C}/10^{-5}$  Torr getrocknet. Das Reinsilybin zeigte im Chromatogramm nur eine Substanzzone.

Schmelzpunkt:  $169 - 173^{\circ}\text{C}$

opt. Drehung  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  :  $+ 10,0^{\circ}$  (in Aceton,  $c = 1,021$ )

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  :  $0,501 \cdot 10^3$

$\log \epsilon$  :  $4,383$

Die UV-Absorptionsmessung wurde bei 288 nm durchgeführt.

Zur Herstellung der Standardlösungen für die Direktauswertung wurde Silybin (ohne vorhergehende Hochvakuumtrocknung) in Methanol gelöst und der  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  bestimmt, der Silybingehalt daraus ermittelt und dieser Wert der Bestimmung zugrunde gelegt.

#### 7.3.2. Silydianin

Silydianin wurde in der oben beschriebenen Weise isoliert und chromatographisch auf Reinheit überprüft.

Schmelzpunkt:  $185 - 187^{\circ}\text{C}$

opt. Drehung  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  :  $+ 175^{\circ}$  (in Aceton,  $c = 1,03$ )

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  :  $0,407 \cdot 10^3$

$\log \epsilon$  :  $4,293$

Die UV-Absorptionsmessung wurde bei 288 nm durchgeführt.

Diese Substanz wurde zur Bestimmung des Korrekturfaktors verwendet.

## 7.3.3.

Rutin

Das als Vergleichssubstanz verwendete Rutin wurde von Fa. Merck, Darmstadt hergestellt (Rutin, reinst, krist., DAB 7 - Art.Nr. 500017). Die Arzneibuchware stellt ein Trihydrat des Rutins dar. Die Gehaltsbestimmung nach Vorschrift des DAB 7 ergab einen Gehalt von 100,84% Rutin berechnet auf die getrocknete Substanz. Da nach der Bestimmungsmethode des DAB (Rutin wird hydrolytisch gespalten und das Aglykon Quercetin gravimetrisch erfasst) andere Glykoside oder Aglykone einen zu hohen Gehalt an Rutin vortäuschen können, wurde eine qualitative und quantitative Analyse der UV-Absorption vorgenommen. Die in Methanol aufgenommenen Spektren waren mit den von Mabry u.a.<sup>113)</sup> angegebenen Spektren identisch. Die quantitative UV-Absorptionsmessung nach der von Pohloudek-Fabini und Knütter<sup>114)</sup> vorgeschlagenen Methode entsprach mit  $E = 0,305$  (0,5 mg/50,00 ml und 363 nm) der geforderten Extinktion. Eine Überprüfung auf chromatographischem Weg ergab nur eine Substanzzone mit der für Rutin typischen Fluoreszenz nach Detektion mit DBAÄE/PEG.

## ANHANG 1

## Bezeichnungen und Formeln der Qualitätskontrolle mit statistischen Methoden:

## a) ungepaarte Meßwerte

Eine Größe  $x$  wird mehrmals bestimmt. Die Werte  $x_1, x_2, \dots, x_n$  ergeben den Mittelwert  $\bar{x}$ . Als Maß für die Verteilung der Einzelwerte um den Mittelwert bestimmt man die Varianz  $s^2$ , deren positive Wurzel die Standardabweichung  $s$  ist, den Variabilitätskoeffizienten  $v$  und die mittleren Fehler  $s_s$  für die Standardabweichung und  $s_v$  für den Variabilitätskoeffizienten. Die Summation erfolgt über die Indices 1 bis  $n$ , die in den nachstehenden Gleichungen der Übersichtlichkeit halber weggelassen werden.

|                                                     |                                               |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$                      | $v = \frac{s}{\bar{x}}$                       |
| $s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}$      | $s_s = \frac{s}{\sqrt{2n}}$                   |
| $s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$ | $s_v = \frac{s}{\sqrt{2n}} \sqrt{(1 + 2v^2)}$ |

## b) gepaarte Meßwerte

Aus den Meßwertepaaren  $x_1y_1, x_2y_2, x_3y_3, \dots, x_ny_n$  werden der Korrelationskoeffizient  $r$ , die Testgröße  $T$  und die Regressionsgerade  $y = k + b \cdot x$  bestimmt. Die Größe  $k$  gibt dabei den Achsenabschnitt und die Größe  $b$  das Steigungsmaß der Regressionsgeraden an.

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2] \cdot [n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

$$T = \frac{r \sqrt{n - 2}}{1 - r^2}$$

$$k = \frac{\sum y \sum x^2 - \sum x \sum xy}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

## ANHANG 2

Meßwerte für die Qualitätskontrolle und die statistischen Ergebnisse

a) Zur Präzision der Peakflächenbestimmung

| <u>Scans in Vorwärtsrichtung</u> |        |                                | <u>Scans in Rückwärtsrichtung</u> |        |                                |
|----------------------------------|--------|--------------------------------|-----------------------------------|--------|--------------------------------|
| 1                                | 14,866 | $(\mu\text{Vs} \cdot 10^{-3})$ | 11                                | 15,936 | $(\mu\text{Vs} \cdot 10^{-3})$ |
| 2                                | 15,220 |                                | 12                                | 15,133 |                                |
| 3                                | 15,191 |                                | 13                                | 15,300 |                                |
| 4                                | 15,203 |                                | 14                                | 15,115 |                                |
| 5                                | 15,182 |                                | 15                                | 15,115 |                                |
| 6                                | 14,670 |                                | 16                                | 15,046 |                                |
| 7                                | 14,923 |                                | 17                                | 14,848 |                                |
| 8                                | 14,839 |                                | 18                                | 15,020 |                                |
| 9                                | 14,967 |                                | 19                                | 15,168 |                                |
| 10                               | 14,831 |                                | 20                                | 15,004 |                                |

|             | Gruppe 1 - 10 | Gruppe 11 - 20 | Gruppe 1 - 20 |
|-------------|---------------|----------------|---------------|
| $\bar{x}$ = | 14,989        | 15,079         | 15,034        |
| s =         | 0,19619       | 0,11910        | 0,16447       |
| $s_s$ =     | 0,04387       | 0,02663        | 0,02600       |
| v =         | 1,31%         | 0,79%          | 1,09%         |
| $s_v$ =     | 0,29%         | 0,18%          | 0,17%         |

10 Scans, wobei der Fleck jedesmal neu einjustiert wurde:

|    |        |             |          |
|----|--------|-------------|----------|
| 1  | 15,562 |             |          |
| 2  | 15,398 | $\bar{x}$ = | 15,426   |
| 3  | 15,535 | s =         | 0,013967 |
| 4  | 15,166 | $s_s$ =     | 0,03123  |
| 5  | 15,301 | v =         | 0,91%    |
| 6  | 15,400 | $s_v$ =     | 0,20%    |
| 7  | 15,554 |             |          |
| 8  | 15,591 |             |          |
| 9  | 15,299 |             |          |
| 10 | 15,454 |             |          |

- b) Zur Bestimmung der Präzision, mit der die Bestimmung einer Konzentration Silybin möglich ist (8 Flecke mit jeweils 600 ng Silybin in 50  $\mu$ l Auftragsvolumen):

11 15,762  
12 15,767  
13 15,651

21 15,309  
22 15,336  
23 15,336

31 14,478  
32 14,434  
33 14,345

41 14,345  
42 14,196  
43 14,140

51 13,827  
52 13,952  
53 13,752

61 14,504  
62 14,246  
63 14,300

71 14,450  
72 14,320  
73 14,340

81 15,489  
82 15,211  
83 15,431

Flecke 1 - 8 (= 11 - 83)

$\bar{x}$  = 14,705  
s = 0,64839  
s<sub>s</sub> = 0,09359  
v = 4,41%  
s<sub>v</sub> = 0,64%

Flecke 2 - 7 (= 21 - 73)

$\bar{x}$  = 14,423  
s = 0,46640  
s<sub>s</sub> = 0,07773  
v = 3,23%  
s<sub>v</sub> = 0,54%

- c) Aufstellung der Regressionsgerade einer Silybinkonzentrationsreihe und Bestimmung ihres Korrelationskoeffizienten:

|          |                                    |
|----------|------------------------------------|
| 100 (ng) | 0,258 ( $\mu$ Vs $\cdot 10^{-3}$ ) |
| 200      | 1,410                              |
| 300      | 3,177                              |
| 400      | 4,993                              |
| 500      | 5,718                              |
| 600      | 7,342                              |
| 700      | 8,399                              |
| 800      | 9,604                              |
| 900      | 10,799                             |
| 1000     | 13,566                             |

r = 0,995  
T = 28,117  
k = -1,12050  
b = 0,0138721

## d) Bestimmung des Silydianin-Korrekturfaktors:

| Platte | Fleck | Silybin<br>(ng) | Fläche<br>( $\mu\text{Vs} \cdot 10^{-3}$ ) | Silydianin<br>(ng) | Fläche<br>( $\mu\text{Vs} \cdot 10^{-3}$ ) |
|--------|-------|-----------------|--------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------|
| 1      | 1     | 0000            | 0,000                                      | 1000               | 3,895                                      |
|        | 2     | 200             | 3,335                                      | 800                | 3,924                                      |
|        | 3     | 400             | 8,920                                      | 600                | 2,651                                      |
|        | 4     | 600             | 13,949                                     | 400                | 1,607                                      |
|        | 5     | 800             | 17,832                                     | 200                | 0,533                                      |
|        | 6     | 1000            | 23,263                                     | 0000               | 0,000                                      |
| 2      | 1     | 0000            | 0,000                                      | 1000               | 3,428                                      |
|        | 2     | 200             | 3,196                                      | 800                | 3,349                                      |
|        | 3     | 400             | 8,575                                      | 600                | 2,157                                      |
|        | 4     | 600             | 13,980                                     | 400                | 1,802                                      |
|        | 5     | 800             | 17,981                                     | 200                | 0,641                                      |
|        | 6     | 1000            | 22,403                                     | 0000               | 0,000                                      |

$$\text{Silybin} : b_1 = 0,0243840 \quad b_2 = 0,0239100$$

$$\text{Silydianin: } b_1 = 0,0045205 \quad b_2 = 0,0035605$$

$$K = \frac{b_{SB}}{b_{SD}} \quad K_1 = 5,39409 \quad K_2 = 6,05471 \quad K = 5,72$$

## e) Aufstellung der Regressionsgerade einer Rutinkonzentrationsreihe und Bestimmung ihres Korrelationskoeffizienten:

|     |      |        |                                  |                   |
|-----|------|--------|----------------------------------|-------------------|
| 100 | (ng) | 0,351  | ( $\mu\text{Vs} \cdot 10^{-3}$ ) |                   |
| 200 |      | 1,587  |                                  |                   |
| 300 |      | 3,940  |                                  |                   |
| 400 |      | 6,403  |                                  |                   |
| 500 |      | 9,593  |                                  | $r = 0,9920721$   |
| 600 |      | 11,179 |                                  | $T = 20,8862244$  |
| 700 |      | 12,213 |                                  | $k = -2,28240320$ |
| 800 |      | 15,833 |                                  | $b = 0,0236167$   |
| 900 |      | 19,762 |                                  |                   |

## ANHANG 3

## Berechnungsgrundlagen für die Wertbestimmung von

## a) Silymarinen:

## Meßergebnisse

|          | x (ng)                 | y ( $\mu\text{Vs} \cdot 10^{-3}$ ) |
|----------|------------------------|------------------------------------|
| Standard | 200                    | 5,191                              |
|          | 400                    | 13,772                             |
|          | 600                    | 22,569                             |
|          | 800                    | 26,443                             |
| Extrakt  | Silychristin           | 12,924                             |
|          | Taxifolin + "Flavon X" | 2,257                              |
|          | Silydianin             | 0,873                              |
|          | Isosilybin + Silybin   | 25,985                             |
|          | Dehydroisosilybin (?)  | 1,734                              |
|          | Dehydrosilybin         | 0,781                              |

## Regressionsgerade und Korrelationskoeffizient:

$$\begin{aligned}
 r &= 0,98721 \\
 k &= 1,14450 \\
 b &= 0,0362765
 \end{aligned}$$

Setzt man nun die ermittelten Flächenintegralwerte (y) in die Gleichung der Regressionsgerade ein und löst die Gleichung nach x auf, so erhält man die Werte der einzelnen Silymarine in ng/50 $\mu$ l:

$$\begin{aligned}
 y &= k + b \cdot x \\
 y &= -1,14450 + 0,0362765 x \\
 x &= \frac{y + 1,14450}{0,0362765}
 \end{aligned}$$

Für Silychristin ergibt sich nach dieser Gleichung

$$\text{SC} = \frac{12,924 + 1,14450}{0,0362765} = 387,81 \text{ (ng/50 } \mu\text{l)}$$

Für die übrigen Komponenten ergibt sich:

|           |              |            |
|-----------|--------------|------------|
| SC        | 387,81       | (ng/50 µl) |
| TF + Fl X | 93,77        |            |
| SD        | 55,62        |            |
| ISB + SB  | 747,85       |            |
| DHISB     | 79,35        |            |
| DHSB      | <u>53,08</u> |            |
|           | 1417,48      |            |
|           | =====        |            |

Aus den so errechneten Werten erhält man unter Beibehaltung der im Experimentellen Teil angegebenen Mengen- und Volumenverhältnissen den Gehalt in Drogen und Zubereitungen nach den folgenden Formeln:

Spezialitäten mit Silymarinen als Wirkstoff:

$$\text{Gehalt einer Komponente (mg/Dosis)} = \text{EG} \cdot 10^{-2}$$


---

Mariendistelextrakte:

$$\text{Gehalt einer Komponente (\%)}^{+)} = \frac{\text{EG} \cdot \text{EV} \cdot 10^2}{\text{V} \cdot 10^6 \cdot \text{EW}}$$


---

+ ) bezogen auf die nicht entfettete Droge

EG aus der Regressionsausgleichung errechneter Gehalt  
in 50 µl Auftragevolumen

EV Endvolumen der Drogenextraktion (ml)

V Teilvolumen, das zu 50,00 ml Auftragslösung weiter-  
verdünnt wird (ml)

EW Einwaage (g)

b) Rutin:

Die Gehaltsbestimmung erfolgt analog der Gehaltsbestimmung der Silymarine; die Berechnungsformeln lauten:

$$\text{Gehalt Rutin (mg/Dosis)} = \text{EG} \cdot 2 \cdot 10^{-2}$$


---

$$\text{Gehalt Rutin (\%)} = \frac{\text{EG} \cdot \text{EV} \cdot 10^2}{\text{V} \cdot 10^6 \cdot \text{EW}}$$

# LITERATURVERZEICHNIS

- 1) JABLONSKI A., Z. Physik 94, 38 (1935)
- 2) STAAB H.A., Einführung in die theoretische organische Chemie, 4. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim (1966)
- 3) KONSTANTINOVA-SHLEZINGER M.A., Fluorometric Analysis, übers.v. Kaner N., Oldbourne Press, London (1965)
- 4) LIPPERT E., Fluoreszenzspektroskopie, in Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, 3. Auflage, Bd. 2/1, Anwendung physikalischer und physikalisch-chemischer Methoden im Laboratorium, Verlag Urban und Schwarzenberg, München - Berlin (1961)
- 5) PARKER C.A., Photoluminescence of Solutions, Elsevier Publishing Company, Amsterdam - London - New York (1968)
- 6) KORTÜM G., Kolorimetrie, Photometrie und Spektroskopie, 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1962)
- 7) CHRISTEN H.R., Grundlagen der allgemeinen und anorganischen Chemie, 3. Auflage, Verlag Sauerländer Aarau und Salle Verlag, Frankfurt/M. (1971)
- 8) TURRO N.J., Molecular Photochemistry, Benjamin Press, New York (1965)
- 9) MEIER H. und MÜLLER E., Umschau 73, 138 (1973)
- 10) LEEMANN H.G., STICH K. und THOMAS M., Fortschritt der Arzneimittelforschung (Drug Research), Bd. 6, Birkhäuser Verlag, Basel (1963)
- 11) SEILER N. und MÖLLER H., Chromatographia 2, 470 (1969)
- 12) PASSWATER R.A., Fluorescence News 5-2, 10 (1970)
- 13) PASSWATER R.A. und WELKER P., Fluorescence News 5-3, 5 (1970)
- 14) FREI R.W., J. Chromatogr. 64, 285 (1972)
- 15) PETROWITZ H.J., Int. Symp. für Chromatog. u. Electroph., Bd. 6, Presses Academiques Europeenes S.C., Brüssel (1971)
- 16) KUSSMAUL H., Dissertation, Marburg (1972)
- 17) GEISSLER H., Dissertation, Mainz (1972)
- 18) STAHL E. und JORK H., Zeiss Informationen 16, 52 (1968)
- 19) JORK H., Z. analyt. Chem. 236, 310 (1968)
- 20) JORK H., Int. Symp. für Chromatog. u. Electroph., Bd. 4, Presses Academiques Europeenes S.C., Brüssel (1968)

- 21) JORK H., J. Chromatog. 33, 297 (1968)
- 22) JORK H., Z. analyt. Chem. 221, 17 (1966)
- 23) JORK H., J. Chromatog. 48, 372 (1970)
- 24) JORK H., Habilitationsschrift, Saarbrücken (1969)
- 25) HEZEL U., Angew. Chem. 85, 334 (1973)
- 26) KLAUS R., J. Chromatog. 62, 99 (1971)
- 27) KLAUS R., J. Chromatog. 16, 311 (1964)
- 28) MESSERSCHMIDT W., Präp. Pharmaz. 5, 92 (1970)
- 29) JORK H. und KRAUS L., in Methodicum Chemicum, Bd. 1 Teil 2.4., herausgeg. von Korte F., Georg Thieme Verlag Stuttgart - Academic Press New York - London (1973)
- 30) KLAUS R., J. Chromatog. 40, 235 (1969)
- 31) EBEL S. und HEROLD G., Z. analyt. Chem. 266, 281 (1973)
- 32) POLLAK V., J. Chromatog. 63, 145 (1971)
- 33) EBEL S. und KUSSMAUL H., Z. analyt. Chem. 268, 268 (1974)
- 34) EBEL S. und KUSSMAUL H., Z. analyt. Chem. 269, 10 (1974)
- 35) EBEL S. und HEROLD G., Z. analyt. Chem. 270, 19 (1974)
- 36) EBEL S. und HEROLD G., Dtsch. Lebensm. Rundschau 70, 133 (1974)
- 37) EBEL S. und HEROLD G., Z. analyt. Chem. 266, 281 (1973)
- 38) POLLAK V. und BOULTON A.A., J. Chromatog. 63, 87 (1971)
- 39) TREIBER L.R., NORDBERG R., LINDSTEDT und STÖLLNBERGER, J. Chromatog. 63, 211 (1971)
- 40) JORK H., J. Chromatog. 82, 85 (1973)
- 41) TREIBER L.R., J. Chromatog. 69, 399 (1972)
- 42) TREIBER L.R., ÖRTENGREN B., LINDSTEN R. und ÖRTENGREN T., J. Chromatog. 73, 151 (1972)
- 43) KUBELKA P. und MUNK F., Z. techn. Physik 12, 593 (1931)
- 44) KUBELKA P. und MUNK F., J. Opt. Soc. Amer. 38, 448 u. 1067 (1948)
- 45) JORK H., Planta med. 13, 489 (1965)
- 46) EBEL S. und KUSSMAUL H., Chromatographia 7, 197 (1974)
- 47) GRIMM W., J. Chromatog. 89, 39 (1974)
- 48) BRAUN W. und KORTÜM G., Zeiss-Mitteilungen 4, 379 (1968)
- 49) EICH E., GEISSLER H., MUTSCHLER E. und SCHUHNACK W., Arzneimittel-Forsch. 19, 1895 (1969)

- 50) SCHUHNACK W., EICH E., MUTSCHLER E. und ROCHELMMEYER H.,  
Arzneimittel-Forsch. 19, 1756 (1969)
- 51) WHITE CH. E. und WEISSLER A., Anal. Chem. 38, 155 R (1966)
- 52) WHITE CH. E. und WEISSLER A., Anal. Chem. 40, 116 R (1968)
- 53) WHITE CH. E. und WEISSLER A., Anal. Chem. 42, 57 R (1970)
- 54) WHITE CH. E. und WEISSLER A., Anal. Chem. 44, 182 R (1972)
- 55) WEISSLER A., Anal. Chem. 46, 500 R (1974)
- 56) POLLAK V. und BOULTON A.A., J. Chromatog. 72, 231 (1972)
- 57) TAUSCH W., Chimia 23, 46 (1969)
- 58) JÄNCHEN D.E., in Shellard, Quantitative Paper- and Thin-Layer  
Chromatography, Academic Press, New York - London (1968)
- 59) BOULTON A.A., J. Chromatog. 63, 141 (1971)
- 60) DOSS M., ULSHÖFER und PHILIPP-DORMSTON, J. Chromatog. 63,  
113 (1971)
- 61) EGG D. und HUCK H., J. Chromatog. 63, 349 (1971)
- 62) GEISSLER H.E. und MUTSCHLER E., Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
12, 151 (1974)
- 63) FÖRSTER H., BRUHN U. und HOOS I., Arzneimittel-Forsch. 22, 1312  
(1972)
- 64) NIWAGUCHI T. und INONE T., J. Chromatog. 59, 127 (1971)
- 65) STEINIGEN M., Dtsch. Apotheker Ztg. 112, 51 (1972)
- 66) PÖTTER H. und VOIGT R., Pharmazie 22, 198 (1967)
- 67) HAMMERSTEIN F. und KAISER F., Planta med. 21, 5 (1972)
- 68) LUGT C.B. und NOORDHOEK-ANANIAS L., Planta med. 25, 267 (1974)
- 69) DOELKER E., KAPÉTANIDIS J. und MIRIMANOFF A., Pharm. Acta  
Helv. 44, 647 (1969)
- 70) WILDANGER W. und HERRMANN K., Z. Lebensm.-Unters. Forsch.  
152, 134 (1973)
- 71) WILDANGER W. und HERRMANN K., J. Chromatog. 76, 433 (1973)
- 72) HIGNETT R.C., J. Chromatog. 31, 571 (1967)
- 73) FLÜCK H. und SCHWABE H., Planta med. 16, 257 (1968)
- 74) IBRAHIM R.K., J. Chromatog. 42, 544 (1969)
- 75) LUCKNER M., Der Sekundärstoffwechsel in Pflanze und Tier, G. Fischer  
Verlag, Stuttgart, S. 311 (1969)
- 76) WAGNER H., DIESEL P. und SEITZ M., Arzneimittel-Forsch. 24, 466  
(1974)

- 77) RAGANATHAN K.R. und SESHADRI T.R., Tetrahedron Letters 36, 3481 (1973)
- 78) WAGNER H., HÖRHAMMER L. und SEITZ M., Arzneimittel-Forsch. 18, 696 (1968)
- 79) LIPFERT R. und HONERLAGEN H., Dtsch. Apotheker-Ztg. 110, 873 (1970)
- 80) HALBACH G. und GÖRLER K., Z. Naturforsch. 26b, 971 (1971)
- 81) STAHL E., Dünnschichtchromatographie, 2.Aufl., Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1967)
- 82) GEISSMAN T.A., The chemistry of flavonoid compounds, Pergamon Press, Oxford - London - New York - Paris (1962)
- 83) MERCK E., Anfärbereagentien (1970)
- 84) WILSON C.W., J. Amer. Chem. Soc. 61, 2303 (1939)
- 85) TAUBÖCK K., Naturwissenschaften 30, 439 (1942)
- 86) LANGHAMMER L. und HÄNSEL R., Scientia pharmac. 41, 129 (1973)
- 87) NEU R., Chem. Ber. 87, 802 (1954)
- 88) NEU R., Z. analyt. Chem. 151, 21 (1956)
- 89) NEU R., Z. analyt. Chem. 153, 183 (1956)
- 90) NEU R., Z. analyt. Chem. 142, 335 (1954)
- 91) NEU R., Z. analyt. Chem. 143, 30 (1954)
- 92) NEU R., Fette, Seifen, Anstrichm. 57, 568 (1955)
- 93) NEU R., Naturwissenschaften 43, 82 (1956)
- 94) NEU R., Naturwissenschaften 45, 311 (1958)
- 95) NEU R., Chem. Ber. 88, 1761 (1955)
- 96) NEU R., Mikrochim. Acta 1956, 1169 (1956)
- 97) NEU R., Mikrochim. Acta 1958, 715 (1958)
- 98) NEU R., Fette, Seifen, Anstrichm. 59, 823 (1957)
- 99) Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, 4. Neuausgabe, Band 1, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, S. 169 (1967)
- 100) DOERFFEL K., Beurteilung von Analysenverfahren und -ergebnissen, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, herausgeg. v. J.F. Bergmann-Verlag, München (1965)
- 101) FISCHBECK K., Logarithmische Rechentafel, 100. Auflage, W. de Gruyter u. Co, Berlin (1969)
- 102) KREYSZIG E., Statistische Methoden und ihre Anwendungen, 3. Auflage, Vandenhoeck u. Ruprecht, Göttingen (1972)

- 103) GEISS F., Parameter der Dünnschichtchromatographie, Friedrich Vierweg u. Sohn, Braunschweig (1972)
- 104) HALBACH G. und TROST W., Arzneimittel-Forsch. 24, 866 (1974)
- 105) STEINEGGER E., Pharmac. Acta Helv. 36, 662 (1961)
- 106) BERLIN J., KISS P., MÜLLER-ENOCH D., GIERSE D. und BARZ W., Z. Naturforsch. 29c, 374 (1974)
- 107) WILLIAMS C.A. und MURRAY B.G., Phytochemistry 11, 2507 (1972)
- 108) MURRAY B.G. und WILLIAMS C.A. Nature 243, 87 (1973)
- 109) BALBAA S.I., ZAKI A.Y. und EL SHAMY A.M., Planta med. 25, 325 (1974)
- 110) HOROWITZ R.M. und GENTILI B., J. Amer. Chem. Soc. 82, 2803 (1960)
- 111) BOURWIEG D. und POHL R., Planta med. 24, 304 (1973)
- 112) WAGNER H., HÖRHAMMER L., DIRSCHERL R., FARKAS L. und NÓGRÁDY M., Chem. Ber. 101, 1186 (1968)
- 113) MABRY T.J., MARKHAM K.R. und THOMAS M.B., The Systematic Identification of Flavanoids, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, Spektren: Nr. 69 (1970)
- 114) POHLOUDEK-FABINI R. und KNÜTTER S., Pharmazie 17, 520 (1962)
- 115) LUCKNER M., Prüfung von Drogen, VEB G. Fischer-Verlag, Jena, S. 218 (1966)



Das Thema dieser Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. H. Wagner vorgeschlagen, dem ich für wissenschaftliche Anregungen und Ratschläge sehr herzlich danke.

Mein Dank gilt weiter der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft, die durch Überlassung des Spektralfluorometers MPF 3 und der für die Direktauswertung erforderlichen Zusatzgeräte die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte.

Herrn Dr. J. Hölzl, Akad. Direktor am Institut für Pharmazeutische Arzneimittel-lehre der Universität München danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und für zahlreiche wertvolle Hinweise.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, Frau M. Seitz für die Isolation der Silymarine und die Durchführung von Vergleichsmes-sungen.

Herrn Prof. Dr. D. Fritz und Herrn Dipl.-Ing. Dr. Ch. Franz, Institut für Gemüse-bau der Technischen Universität München-Weihenstephan danke ich für die Überlas-sung von Drogenmustern aus den Mariendistel-Anbauversuchen.

Fa. Madaus, Köln, bin ich für die Überlassung einiger Drogenmuster zu Dank ver-pflichtet.

Herr Prof. T.R. Seshadri, F.R.S. Department of Chemistry, University of Delhi, hat mir freundlicherweise Hydnocarpin als Vergleichssubstanz zur Verfügung gestellt.

Herrn Dr. Th. Küspert, Fa. Perkin Elmer Bodenseewerk Überlingen, und Herrn K.H. Müller, Fa. Macherey und Nagel, Düren, danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit durch Überlassung von Geräten.



# LEBENS LAUF

|                                       |                                                                                                                                    |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Paul Diesel                           | geboren am 14.12.1945 in Sonthofen/Allgäu                                                                                          |
| Eltern:                               | Kurt Diesel, Apotheker, und Gertrud Diesel, geb. Völkl, Apothekerin                                                                |
| Wohnort:                              | Weilheim/Oberbayern                                                                                                                |
| Schulbildung:                         | 1951 - 1956 Volksschule Weilheim<br>1956 - 1965 Oberrealschule mit Gymnasium Weilheim                                              |
| Berufsausbildung<br>Praktikantenzeit: | 1965 - 1967 in der Bahnhof-Apotheke, Weilheim                                                                                      |
| Pharm. Vorprüfung:                    | 25.9.1967 in München                                                                                                               |
| Studium der Pharmazie:                | WS 1967 - SS 1970 an der Ludwig-Maximilians-Universität, München                                                                   |
| Pharm. Staatsprüfung:                 | 9.10.1970                                                                                                                          |
| Approbation:                          | 2.12.1971                                                                                                                          |
| Wissenschaftliche Tätigkeit:          | Ab November 1970 unter Anleitung von Prof. Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München |
| Wehrübung:                            | 5.6.1972 - 2.9.1972 am Institut für Wehrpharmazie und Lebensmittelchemie, München                                                  |
| Stipendium:                           | Ab 1.4.1972 erhielt ich ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz                                                        |









